

JÉSSYCA CRISTINE PAVANELLI

Modularidade gênica das famílias da dissulfeto isomerase proteica e do inibidor da dissociação de guanina: estudos computacionais, moleculares e funcionais.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
doutor em ciências
Programa de Cardiologia
Orientador: Prof^o Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2016

JÉSSYCA CRISTINE PAVANELLI

Modularidade gênica das famílias da dissulfeto isomerase proteica e do inibidor da dissociação de guanina: estudos computacionais, moleculares e funcionais.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
doutor em ciências
Programa de Cardiologia
Orientador: Prof^o Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pavanelli, Jéssyca Cristine

Modularidade gênica das famílias da dissulfeto isomerase proteica e do inibidor da dissociação de guanina : estudos computacionais, moleculares e funcionais / Jéssyca Cristine Pavanelli. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.Isomerases de dissulfetos de proteínas 2.Inibidores de dissociação do nucleotídeo guanina 3.Sintenia 4.Técnicas de diagnóstico molecular 5.Biologia

*Aos meus pais por dedicarem a vida para que a minha
pudesse ser melhor que a deles, tudo o que sou e me
tornei é graças a vocês!*

Amo vocês!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por ter me concedido a dádiva de viver.

Aos meus pais Eliane e Wagner por todo amor, dedicação e incentivo, por estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas, dando suporte psicológico, financeiro, saber que vocês estão sempre do meu lado me dá forças e segurança para sempre continuar. Agradeço por vocês terem me ensinado os valores da vida.

A minha irmã por sempre me apoiar nas minhas decisões e ser minha melhor amiga.

Aos meus avós Erenice e Narciso por ajudarem em todos os momentos de minha vida, vocês sempre fizeram parte de tudo e tudo o que sou é graças a vocês dois também.

Ao meu orientador Prof. Francisco Rafael Martins Laurindo, por ter me dado a oportunidade de conviver e aprender com um bom cientista, pela orientação e ter sido sempre tão gentil comigo.

A minha amiga Ana Moretti por sempre ter me ajudado a não entrar em desespero nas horas difíceis desse projeto, ter me ensinado a procurar artigos com palavras que eu os encontro e por todo aprendizado científico, você teve um grande papel nessa tese até o último instante.

A todos os familiares que sempre torceram pelo meu sucesso profissional e pessoal.

As minhas amigas Patrícia, Tiffany, Percília do laboratório por todas as discussões científicas e não científicas, pela convivência, pelos nossos almoços no bandeirão e por ter feito os meus dias mais felizes. Com certeza quero que vocês continuem sempre na minha vida.

A todos do laboratório de biologia vascular (LBV), em especial ao Victor Debbas por sempre deixar tudo organizado e pela paciência quando deixava algo bagunçado no laboratório. Você é o melhor especialista de laboratório que já conheci.

As minhas amigas Janaina Brunelli, Janaina Grião e Cintia, por sempre ouvir meus desabaços e pela amizade.

Ao Rodrigo por ter paciência nas horas difíceis e por ter participado dessa etapa importante da minha vida.

As minhas meninas Hanna e Hazel por todo amor e companherismo.

À Ana Garippo, pela assistência técnica no confocal e toda dedicação.

A todos da banca, por terem aceitado o convite.

Use a sua força para guiar seu destino. Tudo o que você desejar com intensidade pode transformar seu caminho. Quem acredita nos seus sonhos tem uma única direção: Sempre em frente".

(Autor desconhecido)

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa), processo 2012/10203-3 (bolsa de doutorado) e 2009/54764-6 (projeto temático); *CEPID de Processos Redox em biomedicina* (2013/07937-8) e pelo *INCT de Processos Redox em Biomedicina* (Redoxoma) (CNPq e FAPESP).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2

Sumário

1. Introdução	2
1.1. Dissulfeto Isomerase protéica (PDI)	2
1.2. Evidências do papel da PDI na modulação funcional do complexo NADPH oxidase	6
1.3. Proteína dissulfeto isomerase e convergencia funcional com GTPases (RhoGDI)	10
1.4. Convergência entre PDI e RhoGTPases (RhoGDI): hipótese do estudo	12
2. Objetivos	16
2.1. Objetivos específicos	16
3. Métodos	18
3.1. Cultura de células endoteliais (HUVEC)	18
3.2. Extração de plasmídeos	18
3.3. Transfecção plasmidial	18
3.4. Co-imunoprecipitação	19
3.5. Microscopia confocal	19
3.6. Detecção da expressão de PDIs, RhoGDIs e β -actina por western blotting	19
3.7 Expressão gênica das PDIs e RhoGDIs por <i>real time</i> PCR	19
3.8 Transcrição reversa	21
3.9. Posição genômica dos genes (PDIs e RhoGDIs) nos genomas	22
3.10. Caracterização molecular dos genes de interesse	22
3.11. Busca por genes vizinhos nos genomas	23
3.12. Predição de microRNAs	23
3.13. Obtenção de sequências de RNAm e proteínas	23
3.14. Alinhamento de sequências	24
3.15. Árvore filogenética	24
3.16. Sítios de ligação a fatores de transcrição	24
4. Resultados	26
4.1. Validação da sintenia entre PDI e RhoGDI	26
4.2. História evolutiva da sintenia	27
4.3. Análise de blocos sintênicos conservados: microssintenia com genes codificando reguladores da fosfatase proteica-1 (PP1)	31
4.4. Análise filogenética	38
4.5. História evolutiva: análise da sintenia PDI/RhoGDI em algas e plantas	42
4.6. Análise da coexpressão tecidual dos pares sintênicos envolvendo RhoGDIs e PDIs	45
4.7. Predição dos sítios de ligação a fatores de transcrição que podem regular os pares sintênicos	48
4.8. Implicações funcionais: expressão combinada de proteínas dos pares sintênicos	54
4.9. Estímulos que podem co-modificar a expressão de PDIA1 e RhoGDI α em células HUVEC	60
4.10. Análises in vitro da interação entre PDIA1 e RhoGDI α	61
5. Discussão	65
6. Conclusões	75
7. Referências	77

Sumário de Figuras

Figura 1. Representação esquemática das composições de domínio das 21 proteínas na família do gene PDI em humanos.	4
Figura 2. Estrutura de múltiplos domínios da PDI. A. Estrutura modular da PDI, com destaque para cisteínas presentes no sítio tiorredoxina e sequência C-terminal KDEL de retenção no RE; B. Estrutura cristalográfica da PDI de levedura.	5
Figura 3. Ciclo de ativação e desativação de RhoGTPases. Papel de GEFs e GAPs na troca GTP/GDP e papel de RhoGDI em esconder o resíduo lipídico da GTPase inativa.	11
Figura 4. Localização cromossômica dos genes sintênicos PDIA1 e RhoGDI α , PDIA2 e RhoGDI γ e PDIA8 e RhoGDI β .	27
Figura 5. Figura representação o bloco de genes que compõem a estrutura genômica de PDIA1, PDIA2 e PDIA8. Os números indicam o ortólogo em cada organismo. A) Bloco de genes sintênicos a PDIA1. B) Bloco de genes sintênicos a PDIA2. C) Bloco de genes sintênicos a PDIA8. Os genes estão alinhados em colunas para ilustrar ortologia. O cromossomo em que o bloco está localizado está representado a esquerda da figura.	32
Figura 6. Esquema evolutivo representativo dos diferentes arranjos gênicos entre as proteínas PDIA1, RhoGDI α e PPP1R27 presentes em diferentes organismos. O esquema foi montado com base no posicionamento gênico, e evidencia também a presença de duplicações na RhoGDI e PPP1R27. As setas indicam o sentido da transcrição.	36
Figura 7. Similaridade das sequências das PDIs e as isoformas do estudo e das RhoGDIs e suas respectivas isoformas.	37
Figura 8. Duplicação da RhoGDI α e PPP1R27 em peixes. comparação do zebrafish, Medaka e Humanos.	38
Figura 9. Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. O bootstrap foi de 500 repetições e está mostrado na árvore. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método P-distância. A análise envolveu 33 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 31 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA6.	40
Figura 10. Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. O bootstrap foi de 500 repetições e está mostrado na árvore. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método P-distância. As análises envolveram 32 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 132 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA6.	41
Figura 11. Sintenia entre PDI e RhoGDI em <i>Arabidopsis thaliana</i> . A sintenia esta localizada no cromossomo 1 e 3. Os genes da PDI estão representados em cinza e da Rhogdi nos círculos cinza escuro.	43
Figura 12. Processos biológicos associados aos fatores de transcrição identificados pelos sítios de ligação às regiões vizinhas aos genes de PDIA1 e RhoGDI α .	52
Figura 13. Processos biológicos associados aos fatores de transcrição identificados pelos sítios de ligação às regiões vizinhas aos genes de PDIA2 e RhoGDI γ .	53
Figura 14. Processos biológicos associados aos fatores de transcrição identificados pelos sítios de ligação às regiões vizinhas aos genes de PDIA8 e RhoGDI β .	53

Figura 15. Expressão gênica das RhoGDIs α , β e γ induzidas por ANGII em células endoteliais e por LPS em monócitos. Cinética da expressão gênica das RhoGDIs α , β e γ analisadas por real time PCR em células HUVEC estimuladas com ANGII (A-C) e em THP-1 estimulada com LPS (D-F). Em (A e D) RhoGDI α , (B e D) RhoGDI β e (C e F) RhoGDI γ . Os gráficos mostram média erro padrão da média, $p < 0,05$ é considerado significativo.	55
Figura 16. Expressão da RhoGDI α em células Hek293T 24 hs após superexpressão da PDIA1. A extração do mRNA foi feita 24h após a transfecção.	56
Figura 17. Expressão da PDIA2 em células Hek293T super-expressadas com RhoGDI γ . A extração do mRNA foi feita 24h após a transfecção.	56
Figura 18. Expressão da RhoGDI β em células Hek293T super-expressadas com PDIA8. A extração do mRNA foi feita 24h após a transfecção.	57
Figura 19: Expressão gênica de PDIA1 (A), RhoGDI α (B) e do housekeeping GAPDH (C) mediadas pela superexpressão de PPP1R27 em células endoteliais. A análise dos genes foi realizada por RT-PCR. Experimentos realizados em duplicata com $n=3$ por grupo.	59
Figura 20: Expressão protéica de PDIA1 e RhoGDI α mediadas pela superexpressão de PPP1R27 em células endoteliais. A análise das proteínas foi realizada pela técnica de western blotting. Experimentos realizados em duplicata.	60
Figura 21. Expressão gênica da PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGDI α , RhoGDI γ e RhoGDI β em células Huvec.	61
Figura 22. Expressão protéica de PDIA1 e RhoGDI α em células endoteliais humanas da linhagem HUVEC.	61
Figura 23. Interação física entre RhoGDI α e PDIA1 em células HUVEC no estado basal. Imunoprecipitação da RhoGDI seguido por Western blot da PDIA1. O experimento foi repetido 3 vezes.	62
Figura 24. Expressão da RhoGDI α nascélulas dos animais transgênicos que super-expressam a PDIA1.	63
Figura 25. Microscopia confocal para o par sintênico PDIA1 e RhoGDI α em células HUVEC em seu estado basal mostrou correlação significativa com coeficientes de Pearson de até 88%.	63

Sumário de Tabelas

Tabela 1. Anticorpos que foram utilizados para marcação de PDI(s) e RhoGDI(s).	20
Tabela 2. Sequências de pares de <i>primers</i> utilizada na amplificação das sequências de PDI(s) e RhoGDI(s).	22
Tabela 3. A tabela mostra a posição dos genes PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGDI α , RhoGDI β e RhoGDI γ e sentido da leitura.	27
Tabela 4. Posição dos genes PDIA1, RhoGDI α , PDIA2, RhoGDI γ , PDIA8 e RhoGDI β em diferentes organismos. Os genes duplicados estão anotados com os números (1/2) e (2/2). A sintenia de todos os genes estudados está bem estabelecida de anfíbios a humanos. Todas as informações foram extraídas do Ensembl 2014.	29
A) Distribuição dos genes PDI e RhoGDI em mamíferos.	29
B) Distribuição dos genes PDI e RhoGDI em Peixes, Anfíbios e Répteis.	30
Tabela 5. PDIs e RhoGDIs encontradas no genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Localização das PDIs e RhoGDIs no genoma e evidência da macro- mas não microssintenia dos genes PDI e GDI.</i>	30
Tabela 6. Posição dos genes PDIA1, ARHGDI α , PPP1R27, PDIA2, ARHGDI β , AXIN1, PDIA8, ARHGDI γ e WBP11 em diferentes representantes evolutivos. Os genes duplicados estão anotados com os números (1/2) e (2/2). A sintenia entre todos os genes estudados é bem estabelecida a partir de anfíbios e conservada até humanos. Todas as informações foram extraídas do Searle Ensembl 2014.	34
Tabela 7. PDIs e RhoGDIs encontradas nos cromossomos de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	43
Tabela 8. Localização cromossômica das PDIs e RhoGDIs no genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i> . Para verificar a homologia com a proteína dissulfeto isomerase de humanos, fizemos uma análise “Blast” a fim de localizar o gene correspondente.	44
Tabela 9. Predição da localização tecidos em que as proteínas de interesse PDIs (PDIA1, PDIA2 e PDIA8), RhoGDIs (RhoGDI α , β e γ), PPP1R27, AXIN1 e WBP11 são expressos. A tabela também informa os loci gênicos, número dos cromossomos e o sentido de transcrição gênica.	46
Tabela 10. Fatores de transcrição preditos pelo Projeto ENCODE que estão associados a PDIs e RhoGDIs de humanos.	49
Tabela 11. Fatores de transcrição preditos pelo Projeto ENCODE que estão associados a PDIs e RhoGDIs e são conservados em humanos, ratos e camundongos.	51

Lista de abreviaturas

AXIN1	<i>Axis Inhibition Protein</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
Ero- 1	<i>Endoplasmic reticulum oxidase 1</i>
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical humana do inglês, <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> .
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nox	Isoforma da NADPH oxidase (Non phagocytic oxidase)
PDIA1	Dissulfeto isomerase protéica membro 1
PDIA2	Dissulfeto isomerase protéica membro 2
PDIA8	Dissulfeto isomerase protéica membro 8
PPP1R27	<i>Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit</i>
RE	Retículo endoplasmático
RhoGDI α	Inibidor de dissociação de guanina alfa do inglês, <i>GDP dissociation inhibitor alpha</i>
RhoGDI β	Inibidor de dissociação de guanina beta do inglês, <i>GDP dissociation inhibitor beta</i>
RhoGDI γ	Inibidor de dissociação de guanina gama do inglês, <i>GDP dissociation inhibitor gamma</i>
SFB	Soro fetal bovino
TG	Transgênico
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
VSMC	Célula muscular lisa vascular do inglês, <i>Vascular smooth muscle cells</i>
WBP11	<i>WW Domain Binding Protein 11</i>

Resumo

2016 Pavanelli J C P. Modularidade gênica das famílias da dissulfeto isomerase proteica e do inibidor da dissociação de guanina: estudos computacionais, moleculares e funcionais [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Vias redox são importantes reguladores da homeostase e sinalização celular, mas o entendimento dos mecanismos desses processos é incompleto. Tio-proteínas como a dissulfeto isomerase proteica (PDI) podem ser moduladores dessas vias. A PDI(PDIA1) é o protótipo da família das PDIs, cuja função canônica é o enovelamento redox de proteínas no retículo endoplasmático. Além disso, PDI exerce regulação de NADPH oxidases, as principais fontes de oxidantes celulares, e é necessária para ativação de RhoGTPases, organização do citoesqueleto e migração de células vasculares. No estudo de mecanismos pelos quais a PDI regula RhoGTPases, mostramos, em redes computacionais e em experimentos de co-imunoprecipitação, associação entre PDIA1 e o regulador de RhoGTPases RhoGDI α . Além disso, identificamos forte proximidade entre os genes codificando estas proteínas. Neste estudo, caracterizamos o perfil e implicações desta sintenia gênica. A análise bioinformática pelos programas Ensembl, NCBI e UCSC evidencia um padrão de sintenia entre diferentes isoformas destas duas famílias: PDIA1 (P4HB), PDIA2 (PDIP) e PDIA8 (Erp27) são vizinhos, respectivamente, a RhoGDI α , RhoGDI γ e RHOGDI β , com correspondentes regiões intergênicas de 7.1, 2.9 e 0.14 kb em distintos cromossomos em *H. sapiens*. O padrão dessa sintenia foi fortemente conservado em *C. elegans*, alguns peixes e uniformemente em anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Leveduras expressam no mesmo cromossomo, porém em locais distantes (i.e. macrossintenia) ortólogos da PDIA1 e RhoGDI α , mas não expressam outras PDIs e RhoGDIssintênicas nos eucariotos complexos. No entanto, sintenia entre PDI e RhoGDI foi também observada na planta *A. thaliana*, sem evidência de um ancestral comum. Os pares sintênicos associam-se a blocos vizinhos conservados, porém diversos para cada par, enquanto cada bloco contém um gene codificando um distinto regulador da PP1 (fosfatase proteica-1). Análise filogenética mostrou topologia semelhante

entre as duas famílias. Análise dos dados do estudo ENCODE e predição pelo *Softberry* identificou sítios de ligação a fatores de transcrição comuns entre os distintos pares, cuja ontologia indicou principalmente desenvolvimento, processos metabólicos e resposta imune. O estudo de possíveis implicações funcionais dessa sintonia mostrou que manipulações da expressão proteica de PDIA1 não promovem mudança consistente na expressão proteica de RhoGDI α , tanto in vitro (silenciamento da PDI por siRNA e superexpressão por vetor lentiviral induzível) como in vivo (camundongo transgênico com superexpressão constitutiva da PDIA1). No entanto, as mudanças da expressão gênica de ambos os genes na camada íntima de artérias carótidas de camundongo durante remodelamento induzido por fluxo foram fortemente correlacionadas. Experimentos de coimunoprecipitação e co-localização à microscopia confocal sugeriram interação física entre PDIA1 e RhoGDI α . Deste modo, estes dados mostram um intrigante padrão de conservação evolutiva da proximidade gênica entre PDIs e RhoGDIs, não usual em eucariotos. Genes sintênicos frequentemente codificam proteínas que tendem a interagir física e/ou funcionalmente. Com efeito, nossos dados sugerem co-regulação e interação física entre PDIA1 e RhoGDI α , corroborando a convergência entre essas proteínas como possível mecanismo envolvido na regulação redox do citoesqueleto pela PDIA1.

Descritores: 1. Isomerasas de dissulfetos de proteínas 2. Inibidores de dissociação do nucleotídeo guanina 3. Sintonia 4. Técnicas de diagnóstico molecular 5. Biologia

Summary

2016 Pavanelli J C P. Genetic modularity of families of protein disulphide isomerase and guanine dissociation inhibitor: computational, molecular and functional studies. (Thesis) Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo”; 2015.

Redox pathways are important regulators of homeostasis and cell signaling, but the understanding of the mechanisms of these processes is incomplete. Thiol proteins such as protein disulfide isomerase (PDI) can be modulators of these pathways. PDI (PDIA1) is the prototype of the family of PDIs whose canonical function is a redox protein folding in the endoplasmic reticulum. In addition, PDI exerts regulatory NADPH oxidase, the main sources of cellular oxidant, and is required for activation RhoGTPases, cytoskeletal organization and migration of vascular cells. In the study of mechanisms by which regulates PDI RhoGTPases, we showed in computer networks and co-immunoprecipitation experiments association between PDIA1 and the regulator of RhoGTPases, RhoGDI α . In addition, we identified strong proximity of the genes encoding these proteins. In this study, we characterize the profile and implications of this synteny. A bioinformatic analysis by programs Ensembl, NCBI and UCSC shows a pattern of synteny between different isoforms of these two families: PDIA1 (P4HB), PDIA2 (PDIP) and PDIA8 (Erp27) are neighbors, respectively RhoGDI α , and RhoGDI γ RHO GDI β with corresponding intergenic regions 7.1, 2.9 and 0:14 kb in different chromosomes of *H. sapiens*. The pattern of this synteny was strongly maintained in *C. elegans*, some fish and evenly amphibians, reptiles, birds and mammals. Yeasts express on the same chromosome, but in distant places (i.e macrosintenia) orthologs of PDIA1 and RhoGDI α , but do not express other syntenics PDIs and RhoGDIs in complex eukaryotes. However, synteny between PDI and RhoGDI was also observed in the plant *A. thaliana*, no evidence of a common ancestor. The syntenic pairs are associated with the stored neighboring blocks, but different for each pair, while each block contains a gene encoding a regulator of distinct PP1 (protein phosphatase-1). Phylogenetic analysis showed similar topology between the two families. The identified binding sites common transcription factors between

different pairs, which mainly indicated ontology development, metabolic and immune response. The study of possible functional implications of synteny showed that manipulations of PDIA1 protein expression do not promote consistent change in protein expression RhoGDI α , both in vitro (silencing of PDI by siRNA and overexpression of inducible lentiviral vector) and in vivo (transgenic mice overexpressing constitutive of PDIA1). The study of possible functional implications of synteny showed that manipulations of PDIA1 protein expression do not promote consistent change in protein expression RhoGDI α , both in vitro (silencing of PDI by siRNA and overexpression of inducible lentiviral vector) and in vivo (transgenic mice overexpressing constitutive of PDIA1). However, changes of gene expression of both genes in the intima of mouse carotid arteries during remodeling induced by flow were strongly correlated. Immunoprecipitation experiments and co-location to confocal microscopy suggested physical interaction between PDIA1 and RhoGDI α . Thus, these data show an intriguing pattern of evolutionary conservation of gene proximity between POIs and RhoGDIs not common in eukaryotes. syntênicos genes often encode proteins that tend to interact physically and / or functionally. Indeed, our data suggest co-regulation and physical interaction between PDIA1 and RhoGDI α , supporting the convergence of these proteins as a possible mechanism involved in redox regulation of cytoskeleton by PDIA1.

Descriptors: 1. Isomerases of disulfide of proteins 2. Inhibitor dissociation of nucleotide guanine 3. Synteny 4. Molecular techniques 5. Biology

1.Introdução

1. Introdução

Vias redox de homeostase e sinalização celular constituem-se em importantes mecanismos reguladores celulares. O conceito central na transdução de sinais redox é a produção de intermediários reativos, que modificam moléculas efetoras e proteínas por meio de processos de transferência de elétrons em cadeia. Apesar dessa aparente simplicidade, existem importantes desafios ao entendimento de como essas múltiplas reações e alvos moleculares podem ser regulados de modo fino e a toxicidade de intermediários reativos limitada para promover a homeostase tecidual. A compreensão dos mecanismos desses processos é essencial para esclarecer suas inúmeras potenciais implicações fisiopatológicas (Winterbourn, 2008). Neste sentido, um dos principais avanços da área tem sido o entendimento do papel de tiol-proteínas e dos estados intermediários de oxidação de cisteínas redox. Uma das principais famílias de tiol-proteínas com funções básicas na homeostase e sinalização celular é a super-família das tioredoxinas, cujo membro fundador é a própria tioredoxina, caracterizada por um enovelamento específico e presença de domínios ditiol (Cys-X-X-Cys ou CXXC) redox (Lars Ellgaard, 2008). Cerca de 25 % dos tióis da superfície celular são ditióis redox-ativos (Zai et al,1999). Uma importante subfamília da tioredoxina é a família das dissulfeto isomerases proteicas (PDIs).

1.1. Dissulfeto Isomerase protéica (PDI)

A dissulfeto isomerase protéica (PDI), uma chaperona residente no retículo endoplasmático (ER), é uma ditiol-dissulfeto oxidorreductase cuja ação é reduzir, oxidar e isomerizar pontes de dissulfeto em proteínas nascentes destinadas à secreção ou inserção em membranas (Kozlov, G., et al, 2010). Sua função clássica, assim, é promover o enovelamento redox de proteínas no ER, que é a principal localização subcelular da PDI. Equivalentes oxidantes necessários para esta função são providos por uma flavoproteína denominada Ero-1 ("Endoplasmatic reticulum oxidase-1"), a qual por sua vez é reoxidada pela transferência, via FAD, de elétrons para o oxigênio molecular, gerando H_2O_2 (Gross et al, 2006; Tu et al, 2002). Apesar de a PDI conter a sequência

KDEL (lys-asp-glu-leu – Harter et al, 1996) de retenção no ER, evidências crescentes indicam possibilidade de localização fora dessa organela, podendo inclusive ser secretada (Araujo, T., 2015). Nesse contexto, PDI tem sido detectada na superfície de uma variedade de células. Os mecanismos pelo qual a PDI de superfície celular escapa do receptor KDEL, apesar de manter essa sequência C-terminal, não estão claros (Terada et al, 1995, Wilkinson et al., 2004). No ER, devido a condições relativamente oxidantes, a PDI exerce atividade isomerase/oxidase, enquanto fora do ER a PDI atua principalmente como redutase, embora haja alguns exemplos de atividade isomerase (Noiva, 1999, Wilkinson et al, 2004, Neal DE, et al, 2010).

A família de genes da PDI contém 21 membros (Figura 1), variando em composição, arquitetura dos domínios, peso molecular, processamento celular e expressão em tecidos distintos. As proteínas resultantes da transcrição desses genes são parte da superfamília das tiorredoxinas (TRX). De fato, o fator comum entre todos os membros da família PDI é a presença de domínios TRX-simile, que podem ser redox-ativos (domínios a, a' e similares) ou inativos (domínios b, b' e similares). A ação dos membros da família da PDI na proteostase protege a célula contra o estresse do RE, embora apenas alguns dos genes dessa família contenham a sequência “ER-stress (inducing) element” (ERSE) na região promotora, o que não é o caso da PDIA1, o protótipo da família (frequentemente designado simplesmente como PDI), O gene codificante da PDIA1 é P4HB e tem outros sinônimos (Figura 1). Neste trabalho, quando não especificado, PDI significa PDIA1.

Alguns membros específicos da família da PDI são detectados em subcompartimentos celulares que não o ER, ou são expressos em tecidos específicos. A localização e a presença de um curto peptídeo de sinal N-terminal são características de todos os membros da família. Esses peptídeos diferem entre os distintos membros da família e são tipicamente compostos de 15-30 aminoácidos, clivados no ER.

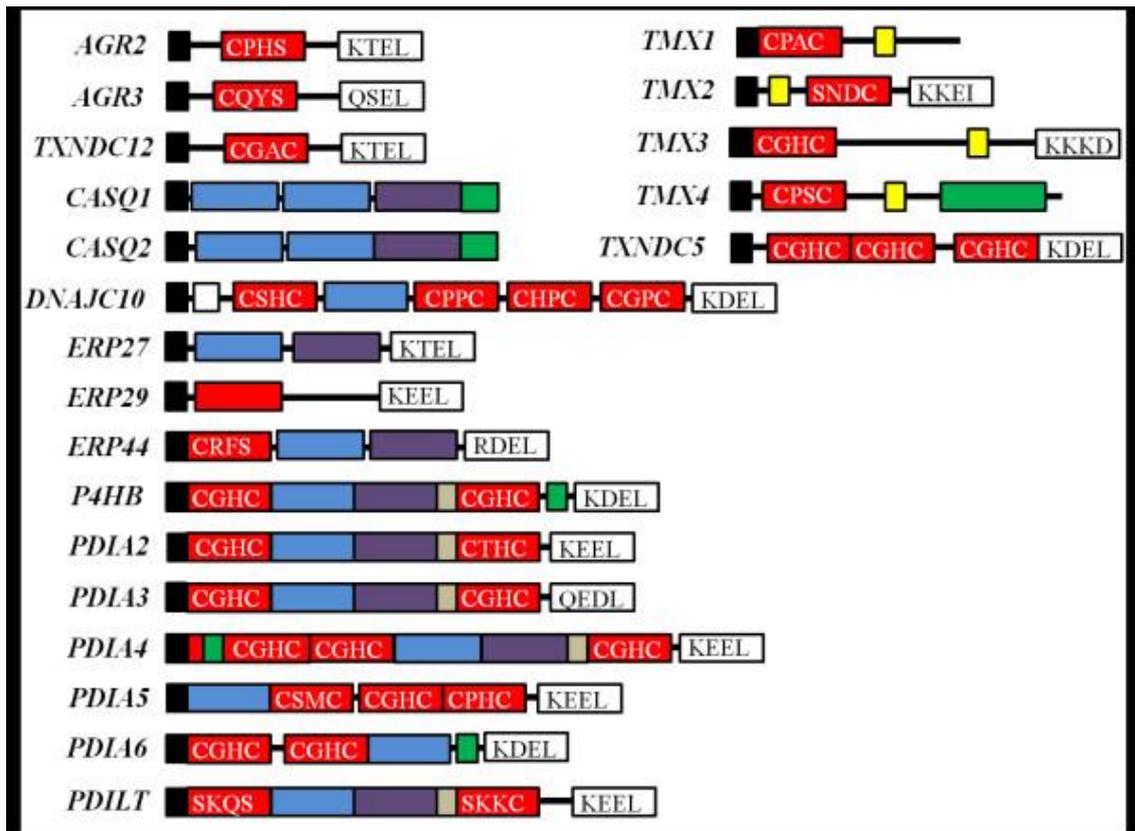
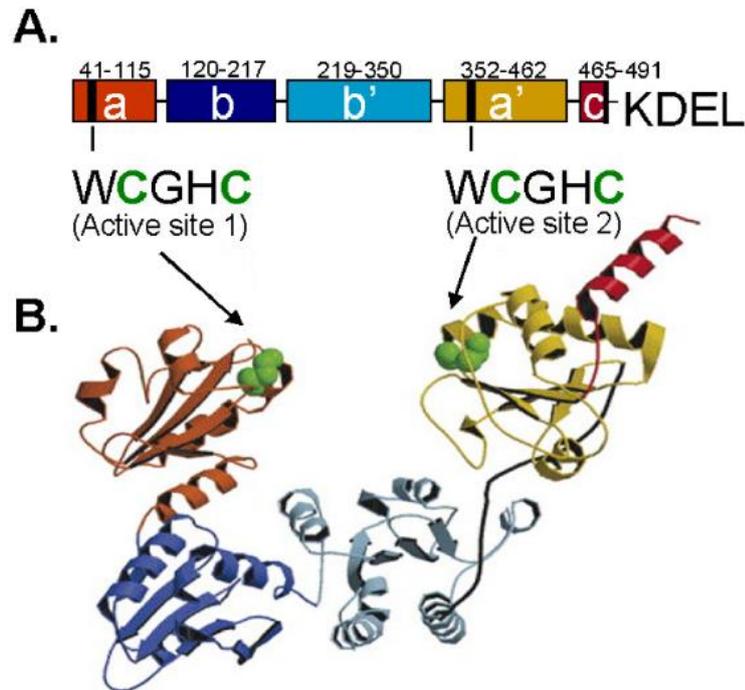


Figura 1. Representação esquemática das composições de domínio das 21 proteínas na família do gene PDI em humanos (Petersen DR, 2012).

Estruturalmente, a PDI tem cinco domínios organizados na sequência a-b-b'-a'-c (Figura 2). Os domínios a e a' da PDI são homólogos à TRX e apresentam sítios redox-ativos independentes (WCGHC), enquanto os domínios b e b' não apresentam o motivo redox, mas tem enovelamento semelhante à tioredoxina e estão relacionados com o reconhecimento/interação da PDI com peptídeos (Ellgaard et al, 2005). O domínio c é um suposto sítio de ligação a Ca^{2+} , e parece ser menos crítico em mamíferos do que em leveduras (Tian et al, 2016). As cisteínas redox-ativas dos domínios a e a' podem estar na forma de ditióis reduzidos, dissulfetos intramoleculares ou dissulfetos mistos. Os domínios a e/ou a' são suficientes para a atividade oxidase ou redutase da PDI, enquanto para isomerizações mais complexas é necessário o envolvimento dos 4 domínios TRX (Wilkinson et al, 2004).



(Laurindo et al, 2008)

Figura 2. Estrutura de múltiplos domínios da PDI. A. Estrutura modular da PDI, com destaque para cisteínas presentes no sítio tioredoxina e sequência C-terminal KDEL de retenção no RE; B. Estrutura cristalográfica da PDI de levedura.

Recentes estudos estruturais avançaram no entendimento dos mecanismos catalíticos da PDI. Estudos com diferentes temperaturas de cristalização indicam que a PDI pode assumir duas diferentes estruturas. A primeira, uma estrutura flexível em forma de “U” (Figura 2), na qual os motivos CGHC têm cooperação mútua, um em cada ponta desse “U”, e a parte interna do “U” (domínios b e b') é responsável pela ligação da proteína a peptídeos (Tian et al, 2006). O domínio b' parece ser o principal sítio de ligação a substratos e assim como o domínio b é rico em resíduos hidrofóbicos. Em mamíferos, um possível modelo é: após a oxidação das cisteínas do domínio a (pela Ero1), há uma mobilidade da região adjacente da molécula, deslocando os domínios a e b', possibilitando maior exposição da região hidrofóbica de ligação a proteínas mal- enoveladas, aumentando assim a atividade chaperona da enzima (Wang et al, 2010). Por outro lado, a redução dessas cisteínas induz um fechamento na estrutura deste “U”, reduzindo a exposição da região

hidrofóbica a peptídeos (Wang et al, 2010). A segunda estrutura é em forma de “barco”, bem mais linear do que a primeira, induzida por uma drástica rotação do domínio α . A função desta última é ainda desconhecida, mas pode refletir uma forma inativa da proteína, ou ainda uma adaptação dessa a substratos ainda maiores (Tian et al, 2008).

A PDI é uma proteína multifuncional. Sua ação canônica é catalisar a formação de pontes dissulfeto por meio de seus domínios redox, embora nem todos os membros da família são capazes de desempenhar esse papel. Além disso, PDI pode agir como uma chaperona molecular prevenindo a agregação proteica; para esta ação, os grupos tiol redox são aparentemente dispensáveis, ocorrendo primariamente pela interação dos substratos com o domínio b' , rico em resíduos hidrofóbicos (Kozlov G., et al, 2010; Laurindo et al, 2012). PDI ainda é componente heterodimérico de enzimas como a prolil 4-hidroxilase (P4HB) e a proteína de transferência de triglicerídeos microsomal. Nem todos os membros dessa família desempenham todos esses papéis.

1.2. Evidências do papel da PDI na modulação funcional do complexo NADPH oxidase

Estudos de nosso grupo têm evidenciado o papel da PDI na modulação funcional do complexo NADPH oxidase, com intuito de buscar os mecanismos redox que regulam a atividade deste complexo (Janiszewski M. et al, 2005). A NADPH oxidase é um complexo enzimático ligado à membrana que é voltado para o espaço extracelular. Ele pode ser encontrado em membranas plasmáticas assim como em fagossomos usados por neutrófilos para fagocitar micro-organismos. As subunidades catalíticas são as NOX1 a 5 e as Duox 1 e 2. A estrutura geral dos complexos de cada tipo de Nox é bastante variável conforme a composição das subunidades reguladoras. Para a Nox2 (Nox do fagócito, o protótipo da família), as principais subunidades regulatórias são: p22phox (heterodímero trans-membrana) e as subunidades citosólicas p47phox, p67phox e p40phox, as principais responsáveis pela ativação do complexo (Lassègue, BandGriendling, K, 2010). Ainda, um importante co-fator é a Rho guanosina trifosfatase (GTPase) Rac1 ou Rac2 (em neutrófilos)(Alloul,

N, 2001). A NADPH oxidase gera superóxido pela transferência de elétrons do NADPH intracelular através da membrana, acoplando-os ao oxigênio molecular, formando o ânion superóxido, um radical livre. No fagócito, superóxido pode ser produzido em fagossomos ou fora da célula, e no fagossomo, o superóxido pode dismutar-se a peróxido de hidrogênio, que pode dar origem a diversas outras espécies reativas de oxigênio (ROS), cuja principal função é bactericida. A família de outros complexos Nox foi expandida significativamente a partir da descoberta da Nox1 (Lambeth, D, 2007) e hoje identifica-se que essencialmente todas as células possuem combinações distintas de complexos Nox que produzem concentrações bem menores de oxidantes do que o fagócito, com finalidade de sinalização celular (Lassègue, B, and Griendling, K, 2010). No sistema vascular, por exemplo, Nox1 em células musculares lisas promove proliferação e migração celular, enquanto Nox4 promove diferenciação e aquiescência (Lassègue, B, and Griendling, K, 2010). No entanto, os mecanismos reguladores de Noxes, principalmente em células não fagocíticas, estão incompletamente conhecidos.

Nosso grupo mostrou pela primeira vez a interação física e particularmente funcional entre a PDI e o complexo NADPH oxidase. Em células musculares lisas de aorta de coelho, a PDI interage fisicamente com as subunidades p22phox, NOX1 e NOX4 do complexo NADPH oxidase. Particularmente, experimentos de perda de função com antagonistas, imunodepleção e oligo nucleotídeos antisense mostraram que a inibição da PDI leva a uma redução de 57-70% na atividade da NADPH oxidase estimulada por angiotensina II (Janiszewski M. et al, 2005). Além disso, estudos posteriores mostraram que a superexpressão induzida da PDI induz espontaneamente (i.e., independentemente de qualquer estímulo adicional) a atividade da NADPH oxidase de membrana, concomitante a um aumento da expressão do mRNA da subunidade NOX1 (Fernandes, D.C., et al, 2009). Em experimentos adicionais, o silenciamento da PDI com siRNA reduziu tanto a expressão do mRNA quanto da proteína NOX1. Surpreendentemente, a transfecção de PDI mutada em suas 4 cisteínas redox também induziu o mesmo grau de ativação espontânea do complexo NADPH oxidase. Assim, a PDI poderia contribuir com a atividade do complexo NADPH oxidase pelo menos em parte por agir como chaperona

para NOX1, contribuindo para a estabilização ou montagem do complexo na configuração ativa (Fernandes, D.C., et al, 2009).

Estes dados indicam que a convergência entre PDI e Nox pode revelar uma importante e inovadora via de sinalização redox associada a funções do ER. No entanto, para evoluir no entendimento dessas vias é essencial investigar os mecanismos da interação entre PDI e proteínas do complexo NADPH oxidase. Neste contexto, estudos realizados em nosso laboratório mostraram a redução da atividade de Rac1 e RhoA pelo silenciamento da PDI na presença de PDGF, evidenciando assim a provável interação entre a PDI e proteínas da família das RhoGTPases (Pescatore et al, 2012). Estes dados são relevantes pelo fato de Rac1 ser uma subunidade essencial à regulação das NADPH oxidases 1,2 e 3, além do fato de as RhoGTPases serem importantes reguladores da organização do citoesqueleto celular, conforme discutido a seguir.

A PDI é uma proteína multifuncional. Sua ação canônica é catalisar a formação de pontes dissulfeto por meio de seus domínios redox, embora apenas alguns membros da família são capazes de desempenhar esse papel. Além disso, PDI pode agir como uma chaperona molecular prevenindo a agregação proteica, ação está na qual os grupos tiol redox são aparentemente dispensáveis, ocorrendo primariamente pela interação dos substratos com o domínio b', rico em resíduos hidrofóbicos (Kozlov G., et al, 2010; Janiszewski M., et al, 2005). PDI ainda é componente de enzimas como a prolil 4-hidroxilase (P4HB) e a proteína de transferência de triglicerídeos microsomal. Nem todos os membros dessa família desempenham todos esses papéis.

Estudos de nosso grupo têm evidenciado o papel da PDI na modulação funcional do complexo NADPH oxidase, com intuito de buscar os mecanismos redox que regulam a atividade deste complexo (Janiszewski M. et al, 2005) mostraram pela primeira vez a interação física e particularmente funcional entre a PDI e o complexo NADPH oxidase. Em células musculares lisas de aorta de coelho, a PDI interage fisicamente com as subunidades p22phox, NOX1 e NOX4 do complexo NADPH oxidase. Particularmente, experimentos de perda de função com antagonistas, imunodepleção e oligonucleotídeos antisense

mostraram que a inibição da PDI leva a uma redução de 57-70% na atividade da NADPH oxidase estimulada por angiotensina II. Além disso, estudos posteriores mostraram que a superexpressão induzida da PDI induz espontaneamente (i.e., independentemente de qualquer estímulo adicional) a atividade da NADPH oxidase de membrana, concomitante a um aumento da expressão do mRNA da subunidade NOX1. Ao contrário, o silenciamento da PDI com siRNA reduziu tanto a expressão do mRNA quanto da proteína NOX1. Surpreendentemente, a transfecção de PDI mutada em suas 4 cisteínas redox também induziu o mesmo grau de ativação espontânea do complexo NADPH oxidase. Assim, a PDI poderia contribuir com a atividade do complexo NADPH oxidase pelo menos em parte por agir como chaperona para NOX1, contribuindo para a estabilização ou montagem do complexo na configuração ativa (Fernandes, D.C., et al, 2009).

Estes dados indicam que a convergência entre PDI e Nox pode revelar uma importante e inovadora via de sinalização redox associada a funções do ER. No entanto, para evoluir no entendimento dessas vias é essencial investigar os mecanismos da interação entre PDI e proteínas do complexo NADPH oxidase. Neste contexto, estudos recentes de nosso laboratório mostraram a redução da atividade de Rac1 e RhoA pelo silenciamento da PDI na presença de PDGF, evidenciando assim a provável interação entre a PDI e proteínas da família das RhoGTPases (Pescatore et al, 2012). Estes dados são relevantes pelo fato de Rac1 ser uma subunidade essencial à regulação das NADPH oxidases 1,2 e 3, além do fato de as RhoGTPases serem importantes reguladores da organização do citoesqueleto celular. Em paralelo, o silenciamento da PDI em VSMC promoveu importante desorganização do citoesqueleto de actina, com fragmentação e anisotropia de fibras de estresse e redução de estruturas de adesão celular. O grau de tais efeitos no citoesqueleto foi maior do que o esperado apenas pela perda de função da Nox1, fazendo supor uma conexão direta entre PDI e regulação do citoesqueleto celular. Com efeito, estudos recentes de nosso grupo têm identificado que as principais redes funcionais construídas a partir do interatoma da PDI (obtido por ensaios de "pull-down") são relacionadas à regulação do citoesqueleto.

1.3. Proteína dissulfeto isomerase e convergência funcional com GTPases (RhoGDI)

As GTPases da família Rho pertencem ao grupo de pequenas proteínas-G que são “interruptores moleculares” bastante importantes em sinalização em praticamente todos os subcompartimentos celulares, porém especialmente envolvidas na organização dinâmica do citoesqueleto celular. As RhoGTPases transitam entre o citoplasma e a membrana celular, são encontradas em plantas, leveduras, invertebrados e vertebrados. Em vertebrados, a família das RhoGTPases consiste em pelo menos 22 proteínas agrupadas nas subfamílias Rho, Rac e CDC42. Essas proteínas são responsáveis por vários processos celulares, incluindo: motilidade celular e adesão, morfologia, tamanho celular e migração, controle transcricional de inúmeros genes, progressão do ciclo celular e citocinese, fagocitose e tráfego vesicular, bem como a regulação de uma gama de funções enzimáticas (Johnson et al, 2009). Como todas as pequenas proteínas G (*small G-proteins*), a transdução de sinal é estimulada por GEFs (*guanine exchange factors*) que catalisam a troca de GDP por GTP, cuja ligação à GTPase determina a ativação da mesma. A ativação é inibida por GAPs (*guanine-activating proteins*), que aumentam a hidrólise do GTP e inativam a GTPase. Diferentes GEFs e GAPs podem atuar de modo específico para determinadas RhoGTPases. Dessa forma, GEFs e GAPs são essenciais à regulação da função de pequenas GTPases (Figura 3).

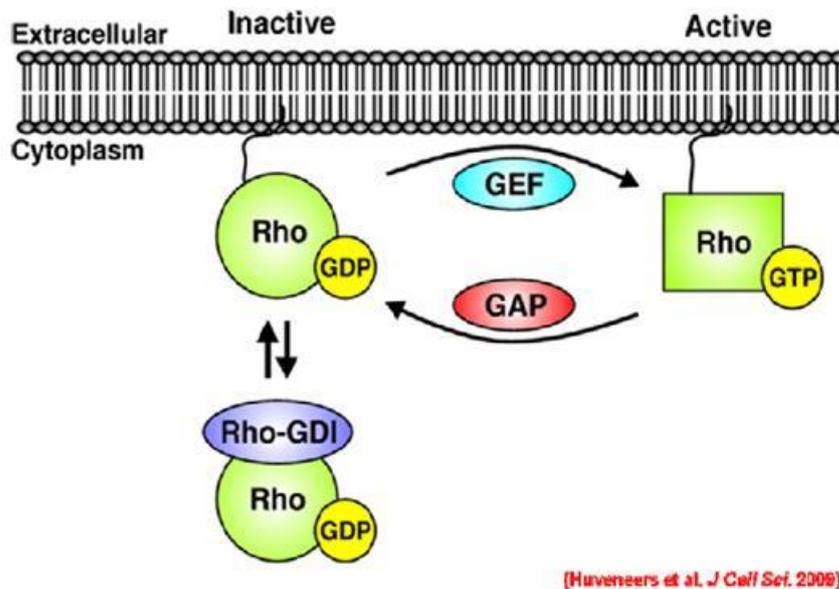


Figura 3. Ciclo de ativação e desativação de RhoGTPases. Papel de GEFs e GAPs na troca GTP/GDP e papel de RhoGDI em esconder o resíduo lipídico da GTPase inativa.

Para ativação de seus efetores, as RhoGTPases precisam se ligar a membrana plasmática. A ligação covalente de proteínas a resíduos lipídicos é necessária para sua ancoragem à membrana plasmática. No caso das RhoGTPases, após a síntese protéica no ribossomo, a proteína é reconhecida pelo motivo CAAX (região C-terminal – C=cys; A=resíduos alifáticos; X=ser, thr, met, leu, ala ou gln), por uma prenil-transferase (Pechlivanis et al, 2006). Prenil transferases modificam a cisteína do motivo CAAX adicionando um tio-éster ligado a farnesil (C15) ou geranylgeranyl (C20). O resíduo X, do motivo CAAX, determina se a proteína será alvo de uma farnesil-transferase ou geranylgeranyl-transferase. A maioria das proteínas da família Rho se liga a geranylgeranyl-transferases. Enquanto a prenilação ocorre no citoplasma, os demais processos pós-prenilação ocorrem na superfície citoplasmática do retículo endoplasmático e no Golgi (Wright & Philips, 2006).

Um outro grupo importante de reguladores de RhoGTPases são os inibidores de dissociação de guanina (RhoGDIs). RhoGDIs são responsáveis por inibir a dissociação do nucleotídeo GDP, por modular o ciclo membrana-citosol das GTPases e proteger as GTPases da degradação proteossomal

(DerMardirossian C., et al, 2006; Bouter E., et al, 2010). RhoGDI liga-se à região C-terminal de RhoGTPases (Rac1, RhoA ou Cdc42 – porém não GTPases de outras famílias, como Rab e Ras), mantendo o grupamento hidrofóbico protegido do meio aquoso do citoplasma (Etienne-Manneville, S. and A. Hall, 2009; DerMardirossian, C., et al, 2006; Olofsson, B., 1999). Esta interação é essencial, pois previne a degradação proteasomal das GTPases (Bouter, E., et al, 2010) e mantém o pool citosólico de GTPases inativas (Olofsson, B., 1999). A ação funcional celular de RhoGDIs é complexa. A par dos efeitos de um modo geral inibidores do pool de RhoGTPases ativas na membrana, RhoGDIs exercem ao mesmo tempo um importante papel organizador da ativação localizada de GTPases para a correta polarização celular. Por exemplo, a regulação de RhoGTPases em plantas evidencia um efeito crucial de RhoGDI na coordenação do crescimento de pelos radiculares (tricoma de raízes, responsáveis pelo aumento da superfície de absorção). O silenciamento desta GDI de plantas gera um crescimento descoordenado das raízes, impossibilitando seu crescimento unidirecional correto. Assim, ao mesmo tempo que RhoGDIs mantém o pool de GTPases inativos no citosol, elas ao mesmo tempo direcionam a inserção dessas em locais específicos da membrana para sua ativação.

Existem 3 isoformas de RhoGDIs em mamíferos: RhoGDI α , expressa ubiquamente, RhoGDI β ou Ly/D4-GDI, presente em células hematopoiéticas e pâncreas e RhoGDI-3 ou γ , que fica ancorada a membrana celular, sendo preferencialmente expressa em cérebro, pâncreas, pulmão e rim (Olofsson, B., 1999).

1.4. Convergência entre PDI e RhoGTPases (RhoGDI): hipótese do estudo

Como discutido acima, nossos experimentos mostraram convergência funcional importante entre PDI e RhoGTPases (Pescatore et al, 2012). Para investigar os mecanismos envolvidos nessas interações, utilizamos, entre outras, ferramentas de biologia de sistemas e bioinformática (em colaboração com o Dr. Diego Bonatto, da UFRGS). Várias bases de dados foram acessadas

e geraram algoritmos de interatomas da PDI, curados manualmente por observador independente. Estes mapas de interações físicas de proteínas mostraram forte convergência entre a PDIA2 e um módulo de interação composto primariamente por RhoGDIs e GTPases da família Rho. Este mapa sugeriu assim a hipótese de uma estreita convergência funcional e possível interação entre PDIA2 (e potencialmente outras PDIs) e RhoGTPases. Além disso, é possível que tal interação seja responsável pela regulação de NADPH oxidaes pela PDI. O significado destes mapas de interação, bem como a potencial natureza das interações proteína-proteína encontradas (i.e., interação física vs. Interação funcional vs. compartilhamento de redes de transcrição) é bastante discutido na literatura (Arkin, A.P. and D.V. Schaffer, 2011) de modo que a evidência deve ser analisada com critério. Há, porém, um certo consenso de que estas evidências geradas por bioinformática são úteis para gerar hipóteses a serem testadas experimentalmente. A interação protéica entre PDI e RhoGDI em humanos e a ação gênica ainda é desconhecida.

O entendimento da estrutura dos genes e regulação da expressão gênica pode proporcionar informações relevantes ao entendimento de aspectos da regulação funcional de uma proteína e, no caso de proteínas associadas, de aspectos mecânicos dessas interações. Neste sentido, uma análise preliminar da localização dos genes PDIA1 e RhoGDI α em humanos indicou que ambos estão localizados lado a lado, a poucos pares de bases de distância, no cromossomo 17 de humanos, ou seja são genes sintênicos. *Sintenia é o termo que se refere à conservação da ordem entre segmentos de cromossomos entre duas ou mais espécies.* A sintenia em eucariotos é relativamente bastante freqüente, porém a regulação ou implicação fisiológica relacionada à sintenia é muito pouco conhecida na literatura. Estudos com a conservação de óperons eucarióticos foram realizados com o mapeamento da sintenia de genes em ortólogos (Drosophila, humanos e outros eucariotos). Enquanto vários genes sintênicos conservados são encontrados, apenas uma minoria pode ser identificada como um óperon de fato funcionante (Trachtulec, Z, 2004). Mais recentemente, foram identificados de modo sistemático vários pares ou tríades de genes denominados "conjoined genes", que são genes

contíguos que podem em vários casos gerar transcritos contendo sequências derivadas de ambos os genes (Prakash, Tulika, et al, 2010).

Desta forma, genes sintênicos codificam proteínas com alta probabilidade de interação física e convergência funcional. Entender em detalhes a ocorrência, características e evolução biológica da estrutura sintênica dos genes de PDI e RhoGDI pode proporcionar uma base importante ao entendimento da ontologia de tal interação. Neste projeto, o principal objetivo foi investigar em detalhes a estrutura e análise evolutiva dessa organização sintênica entre PDIs e RhoGDIs e as possíveis implicações funcionais associadas.

2. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar e avaliar em detalhes a sintonia entre PDIs e RhoGDIs e entender a ontogenia e a possível implicação funcional da interação entre essas proteínas.

2.1. Objetivos específicos

2.1.1. Investigar e caracterizar em detalhes a sintonia entre genes da família de PDIs e RhoGDIs e analisar blocos de genes associados aos pares sintênicos.

2.1.2. Realizar a análise evolutiva da conservação e filogenia da sintonia entre diferentes isoformas de PDIs e RhoGDIs;

2.1.3. Analisar a ontogenia dos sítios de ligação a fatores de transcrição comuns à região promotora e intergênica das PDIs e RhoGDIs;

2.1.4. Investigar a coexpressão, co-regulação e associação proteica entre PDIs e RhoGDIs.

3. Métodos

3. Métodos

3.1. Cultura de células endoteliais (HUVEC)

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) foram cultivadas em meio RPMI (Gibco) suplementado com 20 mM de HEPES, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de mistura de gases 5% de CO₂. Em experimentos específicos, as células ficaram sem soro por 4h ou foram cultivadas no DMEN High glucose para maior eficiência da transfecção.

3.2. Extração de plasmídeos

Os plasmídeos utilizados nas transfecções foram extraídos utilizando o kit da QIAGEN seguindo recomendações e o protocolo do fabricante.

3.3. Transfecção plasmidial

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) foram plaqueadas na densidade 2×10^6 células e cultivadas em meio RPMI (Gibco) suplementado com 20 mM de HEPES, 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera de mistura de gases 5% de CO₂. Para a transfecção, as células foram carenciadas de soro por 5 horas, 24 horas após o plaqueamento. Ao final das 5 horas, o meio foi trocado por novo meio sem soro e sem antibiótico (meio DMEM high glucose). Os plasmídeos foram diluídos em meio de transfecção q.s.p. (meio DMEM high glucose) acrescido de lipofectamina e DNA plasmidial (20 µg). A mistura de transfecção foi preparada segundo as especificações do fabricante (Invitrogen). As células permanecerem 8 horas no meio de transfecção, e ao final deste tempo o meio foi trocado para RPMI acrescido de 10% de SFB, sem antibióticos. As células foram utilizadas 48h após a transfecção.

3.4. Co-imunoprecipitação

Lisados celulares de HUVEC em tampão de lise RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS) acrescido dos inibidores de proteases e fosfatases (1 mg/ml de leupeptina e aprotinina, 100 μ M de PMSF, 1 μ M Mg132 [inibidor de proteassoma], 10 mM MgCl₂), foram incubados com anticorpo contra RhoGDI α (IgGrabbit, ABCAM). O material foi incubado overnight a 4°C sob agitação. Ao final da incubação, 50 μ l de beads magnéticas recobertas com proteína A, foram adicionadas ao lisado e incubadas por 4 horas a 4°C. As beads foram submetidas a lavagens consecutivas em RIPA para remoção de material contaminante. A detecção da PDIA1 foi feita por western blot utilizando anticorpo monoclonal específico clone RL90 da ThermoScientific.

3.5. Microscopia confocal

Células HUVECs em seu estado basal foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 1h em temperatura ambiente e permeabilizadas com PBS contendo Nonidet p40 (0,1%) por 30 minutos, 37°C; seguido por bloqueio em PBS/BSA (2%) por 30 minutos a 37°C. Os anticorpos primários foram incubados por 12h-16h na presença de faloidina/Alexa 633 (1:200). Os anticorpos secundários foram: PDIA1 de camundongo (Enzo Life Science) ou coelho (Enzo Life Science), antiRhoGDI α de camundongo e coelho (Abcam). O DAPI (1:100) foi incubado simultaneamente aos anticorpos secundários conjugados a Alexa (A488 coelho ou A546) camundongo) por 1h 30 min, temperatura ambiente no escuro. Após essas incubações, aplicou-se meio de montagem (50% glicerol em PBS) e fechou-se a lamínula com esmalte para posterior análise.

3.6. Detecção da expressão de PDIs, RhoGDIs e β -actina por western blotting

Amostras foram homogeneizadas em tampão de lise RIPA acrescido de inibidores de proteases (1 mg/ml pepstatina A, 100mM PMSF). Em seguida, as

amostras de lisado foram centrifugadas a 14000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas quantificada pelo método de Bradford. Amostras de 20 e 50 ug/ml de proteína, respectivamente para PDIs, RhoGDIs e β -actina, foram acrescidas de tampão de amostra (2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 60mM Tris pH 6.8, 5% mercaptoetanol, e 0,01% azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em um sistema SDS-PAGE, gel 12% de poliacrilamida (1.5M Tris-HCl, 10% SDS, 30% bis-acrilamida, 10% de persulfato de amônia e TEMED). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad) em aparelho semi-drytransfer (Biorad). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio 1% de BSA (albumina bovina) em tampão TBST (50 mM de tampão Tris, pH 8,0, 100mM NaCl, 0.1% Tween 20) por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos primários (Tabela 1) contra as proteínas de interesse overnight a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução contendo anticorpo secundário conjugado a fluoróforos e expostas ao sistema de detecção Odyssey (LI-COR bioscience). A expressão das proteínas analisadas foi comparada por densitometria de gel, utilizando-se o programa da LI-COR bioscience.

Tabela 1. Anticorpos que foram utilizados para marcação de PDI(s) e RhoGDI(s)

Proteína	Tamanho	Anticorpo
PDIA1	54 Kda	PDI Stressgen (Enzo life Science)
PDIA2	54kda	SAB2500768 SIGMA- Anti-PDIA2/PDIP antibody produced in goat
PDIA8	30 Kda	Anti-ERP27 antibody polyclonal (ab70515) produced Mouse
RhoGDI α	25 Kda	Anti-RhoGDI antibody (ab53850) polyclonal produced in rabbit.
RhoGDI β	26 Kda	WH0000397M1 SIGMA Monoclonal - Anti-ARHGDIB antibody produced in mouse
RhoGDI γ	30 Kda	ARHGDIG Antibody (H00000398-M01) Monoclonal Novus produced in mouse
β -actina	42 kda	A5441 SIGMA Monoclonal Anti- β -Actin antibody produced in mouse

3.7. Expressão gênica das PDIs e RhoGDIs por *real time* PCR

O RNA total de células HUVEC, HEK293T e embriões de camundongos foi extraído com 1 ml Trizol (Invitrogen). O material foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida adicionamos 200 µl de clorofórmio (Merck), os tubos foram agitados e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Segue-se a centrifugação do material a 4°C por 15 minutos a 12000g. O material foi transferido para outro tubo contendo 500 µl de isopropanol gelado. Após incubar por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 12000g. O pellet foi reconstituído em 50 µl de água com 0,1% de Dietilpirocarbonato (Sigma). A partir de 1µg de RNA total, o cDNA foi sintetizado com 1 µl de transcriptase reversa II (Invitrogen); 1 µl de OligodT (0,5 ug/ul - Invitrogen); 1 µl de dNTP (10mM – Invitrogen), 6 µl de buffer 5 X, 2,4 µl de Cloreto de magnésio (25 mM). A reação foi incubada em termociclador por 50 minutos a 42°C e 70°C por 15 minutos. Após a síntese de cDNA, faz-se uma reação de PCR para amplificação de Beta actina como controle positivo e teste da viabilidade de cada amostra. Os níveis dos transcritos para as PDIs e RhoGDIs e β-actina foram determinados por real time PCR com *primers* (Invitrogen) específicos para estes genes e os resultados representados como razão da expressão entre o gene de interesse (PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGDIα, RhoGDIβ e RhoGDIγ) e do gene housekeeping (β-actina).

A reação de real time PCR foi realizada com 20µl de volume total contendo 8,7µl de água deionizada estéril, 10 µl de Platinum SYBR Green qPCRsuperMix- UDG (Invitrogen), 0,4 µl de cada primer a 10 pmol/µl e 1 µl de cDNA em termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo composta por todos os componentes do PCR mix exceto o cDNA.

Tabela 2: Sequências de pares de *primers* utilizada na amplificação das sequências de PDI(s) e RhoGDI(s).

Gene Primer	Primer forward (Fw) e reverse (Rv)
PDIA1	Fw: CACGCTGGATGGTTTTAAGAAAT Rv: ATCCCCTGCCCCATCCT
PDIA2	Fw: GTGGTGCACCCACTGCAA Rv: CCTCGTGGTCTTGGTACTTCTCA
PDIA8	Fw:GCAAAGTAAAAAGGCACAACCTCAA Rv: TTGGCAGGCCTAGTGATCCT
RhoGDIα	Fw: CGCTGTCGGTCCCGTCTA Rv: TGAGGCCCCACGGTACACT
RhoGDIβ	Fw: GAGATGGTCCTGTGGTGACAGA Rv: GGTGAGCCGGGTGACAAC
RhoGDIγ	Fw: AAGGAAGGTGTTGATTACAGAGTGAA Rv: TGAGGCCGCTGACAATCTC

3.8. Transcrição reversa

Para síntese de cDNA através da reação da transcriptase reversa foi utilizado o kit SuperScript® II FirstStrandSynthesis System for RT-PCR (Invitrogen®). Inicialmente normalizou-se o volume total de RNAm obtido nas extrações, através dos dados obtidos pela leitura em 260nm e 280nm em NanoDrop®, visando a aplicação de 500ng de RNAm por reação de síntese de cDNA. Seguiu-se então o protocolo do fabricante para reação de síntese de cDNA.

3.9. Posição genômica dos genes (PDIs e RhoGDIs) nos genomas

As posições genômicas da sequência da PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGDI α , β e γ foram obtidas através do banco de dados ENSEMBL (disponível em <http://www.ensembl.org/index.html>). Todas as sequências foram armazenadas em arquivo Excel com as datas de acesso.

3.10. Caracterização molecular dos genes de interesse

A caracterização molecular foi feita com base nos exons e introns dos genes, extraídos do banco de dados Ensembl (acesso em: <http://www.ensembl.org/index.html>). Neste banco de dados estão armazenados todos os éxons, introns e sua região UTR. Coletamos as sequências da PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGDI α , RhoGDI β e RhoGDI γ no formato FASTA e utilizando a ferramenta de busca do Word, procuramos pelas sequências de éxons e introns dos genes.

3.11. Busca por genes vizinhos nos genomas

A busca por representantes evolutivos que possuem ou não os pares sintênicos, foi feita consultando o banco de dados do Ensembl (acesso em: <http://www.ensembl.org/index.html>) e foram confirmadas no banco de dados Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>). Os valores das posições dos genes foram anotados e foram organizados pela sua distância. Após, foram geradas figuras que ilustram o bloco genômico.

3.12. Predição de microRNAs

A predição dos microRNAs que possivelmente regulam a PDI e a RhoGDI foram localizados através do miRDB (disponível em: <http://mirdb.org/miRDB/>). miRDB é um banco de dados on-line para previsão de microRNA e anotações funcionais. Todos os alvos foram previstos com base no gene alvo. O banco de dados foi desenvolvido baseado nas interações dos microRNA-alvo encontrados em experimentos de sequenciamento e características comuns associados com a ligação de micro-RNA ligados a sequência alvo.

3.13. Obtenção de sequências de RNAm e proteínas

As anotações das sequências de mRNAs e proteínas foram obtidas através do banco de dados NCBI (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Todas as sequências foram armazenadas em formato FASTA e armazenadas em arquivo Excel com as datas de acesso.

3.14. Alinhamento de sequências

As sequências protéicas de PDIs e RhoGDIs de alguns representantes evolutivos foram extraídas do NCBI no formato FASTA e alinhadas pelo ClustalW.

3.15. Árvore filogenética

A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. Foi utilizado um bootstrap de 500 repetições para confiabilidade da árvore. São mostrados ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método P-distância e estão em unidades do número de diferenças de aminoácidos por site. A análise envolveu 33 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 31 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizados no MEGA6.

3.16. Sítios de ligação a fatores de transcrição

Os sítios de ligação a fatores de transcrição dos genes de interesse foram extraídos do projeto Encode, disponível no banco de dados do Genome browser (banco de dados da UCSC). Acesso em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>. Os dados foram curados manualmente e organizados em tabela de Excel. Para cada fator de transcrição encontrado, buscamos pela sua identificação no banco de dados UNIPROT (acesso em: <http://www.uniprot.org/>).

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Validação da sintonia entre PDI e RhoGDI

A análise de bioinformática confirmou a localização sintênica entre PDIA1 e RhoGDI α em humanos, usando os bancos de dados Ensembl Genome e NCBI (bancos de dados do Nacional Institute of Health- NIH). PDIA1 e RhoGDI α são genes microssintênicos no cromossomo 17, com uma distância intergênica de 7.1 kbases. RhoGDI tem 3 isoformas no genoma humano: α , β e γ . Nossa análise revelou que as isoformas RhoGDI β e RhoGDI γ são também sintênicas a genes que codificam para outras proteínas da família das PDI sem outros cromossomos. Especificamente, o gene RhoGDI β é microssintênico ao gene PDIA8 (Erp27) no cromossomo 16 com distância intergênica de 2.9 kbases, enquanto o gene RhoGDI γ é microssintênico a PDIA2 (PDIP) no cromossomo 12, com distância intergênica de 0,14 kbases. (Figura 4). Assim, todos os genes que codificam RhoGDIs são sintênicos a um membro da família da proteína disulfeto isomerase proteica (PDI). Importante, a análise de genes de vários outros membros da família da PDI, bem como de genes da família de RhoGTPases e fatores reguladores associados (vários GAPs e GEFs) não revelou proximidade sugestiva com outros genes da família de RhoGTPases e superfamília das tiorredoxinas (à qual pertencem as PDIs), respectivamente. Desta forma, a microssintenia com PDIs parece um fenômeno bastante específico da família de RhoGDIs, mas o contrário não ocorre, com várias PDIs (inclusive Erp57, Erp72 e Erp46, que são bastante similares à PDIA1) não associadas a sintonias com RhoGTPases e proteínas relacionadas.

Para validar a proximidade entre PDIs e RhoGDIs, realizamos uma busca manual no banco de dados da Universidade de Santa Cruz (UCSC acesso <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) e obtivemos as localizações cromossômicas desses genes. Para cada um dos 3 pares sintênicos, o sentido de leitura é igual. As informações da localização dos genes no cromossomo e o sentido de leitura estão na tabela 3.

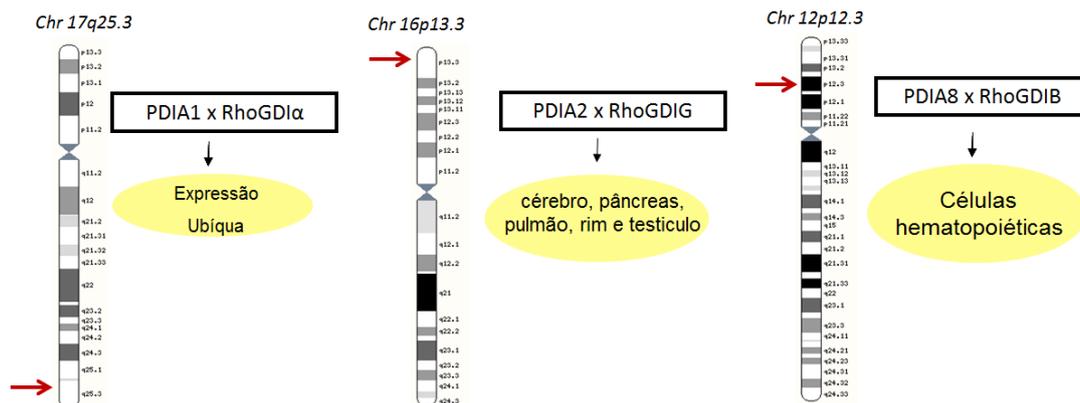


Figura 4. Localização cromossômica dos genes sintênicos PDIA1 e RhoGDI α , PDIA2 e RhoGDI γ e PDIA8 e RhoGDI β .

Tabela 3. A tabela mostra a posição dos genes PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGDI α , RhoGDI β e RhoGDI γ e sentido da leitura.

Genes	Chr	Posição do gene	Sentido de leitura
PDIA1	17	77,394,323-77,411,833	Reverse
RhoGDI α	17	77,418,886-77,422,527	Reverse
PDIA2	16	270,607-277,210	Foward
RhoGDI γ	16	270,607-273,369	Foward
PDIA8 (Erp27)	12	14,958,245-14,982,722	Reverse
RhoGDI β	12	14,986,217-150,058,29	Reverse

4.2. História evolutiva da sintenia

A análise da conservação dos genes ao longo da evolução dos organismos é essencial para o entendimento das microssintenas observadas e pode fornecer inferências importantes sobre a sua relevância funcional. Assim,

foi realizada uma análise extensa em organismos que pudessem esclarecer, demonstrar e validar a sintenia entre PDIs e RhoGDIs. Quanto maior o grau de conservação do bloco de genes em um cromossomo, mais curto é o tempo decorrido desde a divergência a partir de um ancestral comum. Quanto maior este tempo, maior é a possibilidade de ocorrência de mutações e rearranjos cromossômicos. Os genes e sua posição genômica em diferentes organismos estão na tabela 4A, 4B e 4C. Em conjunto, esta análise revela a conservação do arranjo microssintênico para todos os pares de genes: PDIA1 e RhoGDI α , PDIA8 e RhoGDI β , PDIA2 e RhoGDI γ , embora com um padrão específico. A microssintenia para os 3 pares está uniformemente estabelecida em anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Importante, as PDIs e RhoGDIs em anfíbios, répteis, aves e mamíferos são sempre transcritas na mesma direção.

Em peixes, o padrão de microssintenia é bem mais complexo. Inicialmente, nem todas as RhoGDIs são identificáveis, particularmente a RhoGDI β . Embora não se possa a priori descartar que isto se deva a uma anotação incompleta, a ausência dessa isoforma em 4 genomas de peixe (Tabela 4B) é relevante e sugere que essa isoforma não é expressa nesses peixes. RhoGDI γ não foi identificada no Fugu. Importante, a microssintenia não ocorre para nenhum dos 2 pares expressos (PDIA1 e RhoGDI α ; PDIA2 e RhoGDI γ) no peixe-zebra. Por outro lado, no Medaka, Platyfish, peixe-zebra a microssintenia é observada apenas para o par PDIA1 e RhoGDI α , mas não para o par PDIA2 e RhoGDI γ . Além disso, nessas 3 espécies, observa-se uma duplicação do gene da RhoGDI α , com um dos genes em outro cromossomo e outro gene sintênico à PDIA1 (Tabela 4B). Entretanto, em Platyfish, Medaka e Fugu, as direções de transcrição de PDIA1 e RhoGDI α são opostas. No celacanto, a microssintenia é observada para os pares PDIA1/RhoGDI α e PDIA2/RhoGDI γ com a mesma direção da transcrição dos dois genes e sem duplicação desses genes; ao contrário dos outros peixes, RhoGDI β é expressa, mas não PDIA8. Esta análise sugere que a estruturação sintênica das diferentes isoformas dos genes PDIs e RhoGDIs foi claramente estabelecida a partir de anfíbios, mas está já presente no peixe celacanto e incompletamente presente nos peixes menos complexos. A evolução do celacanto é diferente dos

demais grupos de peixes. Alguns autores (Casane e Laurenti, 2013) sugerem que as sequências de genes do celacanto parecem evoluir mais lentamente, e possuem o genoma basicamente do mesmo tamanho que o genoma humano.

Esta análise levou ao estudo de organismos menos complexos (Tabela 4C), que revelou um padrão intrigante. O nematóide *C. elegans* expressa um par de genes para RhoGDI / PDI sintênico, com intervalo intergênico de 13,2 kbases. Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e cnidários (*C. intestinalis*) apresentam PDI e RhoGDI no mesmo cromossomo, mas em localizações distantes, caracterizando macrossintenia mas não microssintenia. A Tabela 5, mostra o padrão de localização dos genes de PDIs e RhoGDIs de leveduras.

Tabela 4. Posição dos genes PDIA1, RhoGDI α , PDIA2, RhoGDI γ , PDIA8 e RhoGDI β em diferentes organismos. Os genes duplicados estão anotados com os números (1/2) e (2/2). A sintenia de todos os genes estudados está bem estabelecida de anfíbios a humanos. Todas as informações foram extraídas do Ensembl 2014.

A) Distribuição dos genes PDI e RhoGDI em mamíferos

Espécie	PDIA1/ARHGDI A	PDIA2/ARHGDI G	PDIA8/ARHGDI B
Camundongo	Chr 11: 120,560,298-120,573,253-PDIA1 Chr 11: 120,578,104-120,581,624-ARHGDI A	Chr17:26,195,99-26,199,087-PDIA2 Chr17:26,196,226-26,207,786-ARHGDI G	Chr6: 136,907,311-136,922,180-PDIA8 Chr6: 136,923,523-136,941,899-ARHGDI B
Humano	Chr17: 79,801,035-79,818,570-PDIA1 Chr17: 79,825597-79,829,282-ARHGDI A	Chr16:333,152-337,215-PDIA2 Chr16:318,726-333,003-ARHGDI G	Chr12: 15,066,969-15,092,016-PDIA8 Chr12: 15,094,951-15,114,662-ARHGDI B
Elefante	Scaff49: 1,132,425-1,142,258-PDIA1 Scaff49: 1,124,625-1,125,901-ARHGDI A	Scaff53: 15,498,835-15,501,529-PDIA2 Scaff53: 15,501,864-15,504,920-ARHGDI G	Scaff2: 4,510,740-4,543,544-PDIA8 Scaff2: 4,545,253-4,554,489-ARHGDI B
Cachorro	Chromosome 9: 427,878-437,440-PDIA1 Chromosome 9: 420,806-422,066-ARHGDI A	Chromosome 6: 40,218,664-40,221,797-PDIA2 Chromosome 6: 40,222,103-40,223,076	Chromosome 27: 31,682,927-31,703,937-PDIA8 Chromosome 27: 31,662,896-31,683,590
Galinha	Chr 18: 10,183,770-10,202,043-PDIA1 Chr 18: 10,205,975-10,214,784-ARHGDI A	Chr14:12,231,749-12,234,668-PDIA2 Chr14:12,235,026-12,237,750-ARHGDI G	Chr1: 47,853,221-47,871,847-PDIA8 Chr1: 47,844,409-47,852,755-ARHGDI B

B) Distribuição dos genes PDI e RhoGDI em Peixes, Anfíbios e Répteis

Espécie	PDIA1/ARHGDI A	PDIA2/ARHGDI G	PDIA8/ARHGDI B
Medaka	Chr1: 3,834,605-3,846,832-PDIA1 Chr1: 3,678,205-3,686,320-ARHGDI A(1/2) Chr8: 15,809,645-15,815,962-ARHGDI A(2/2)	Chr1:24,956,529-24,963,606 – PDIA2 Chr8:17,683,617-17,705,923-ARHGDI G	Chr8: 14,884,366-14,891,238-PDIA8 ----ARHGDI B
Platyfish	JH55674.1:1,381,682-1,393,778-PDIA1 JH556748.1:1,477,912-1,497,986- ARHGDI A(1/2) JH556840.1:581,680-591,522-ARHGDI A (2/2)	JH557131.1:57,168-71,479-PDIA2 JH556814.1:1,051,891-1,060,065 – ARHGDI G	JH556907.1:374,512-381,943-PDIA8 -----ARHGDI B
Peixe-Zebra	Chr6: 19,682,034-19,706,928 –PDIA1 Chr3: 60,305,892-60,353,649-ARHGDI A	Chr1:9,30,573-9,040,849-PDIA2 Chr3:27,864,729-27,920,351-ARHGDI G	Chr 6:117,518-119,391-PDIA8 ----ARHGDI B
Fugu	244: 31,623-38,707-PDIA1 244: 22,539-26,565- ARHGDI A (1/2) 294: 242,253-244,814 – ARHGDI A (2/2)	40:391,877-395,764-PDIA2 ----ARHGDI G	----PDIA8 ----ARHGDI B
Celacanto	Scaff JH126596.1: 90,753-126,432-PDIA1 Scaff JH 126596.1: 74,350-85,376-ARHGDI A	JH127264.1:226,688-283,726-PDIA2 JH127264.1:294,319-425,471-ARGDIG	---PDIA8 JH 129627.1:90,417-96,015-ARHGDI B
Xenopus	GL 172918.1: 1,293,250-1,303,208-PDIA1 GL 172918: 1,354,105-1,361,500-ARHGDI A	Chr14:12,231,749-12,234,668-PDIA2 Chr14:12,199,023-12,229,602-ARHGDI G	GL172795.1: 113,099-120,662-PDIA8 GL172795.1: 93,550-104,246-ARHGDI B
Anole	Chr 2: 118,615,571-118,636,37-PDIA1 Chr2: 118,584,879-118,588,892-ARHGDI A	GL344563.1:23,219-26,733-PDIA2 -----ARHGDI G	Chr5: 27,756,556-27,790,802-PDIA8 Chr5: 27,794,455-27,803,171-ARHGDI B

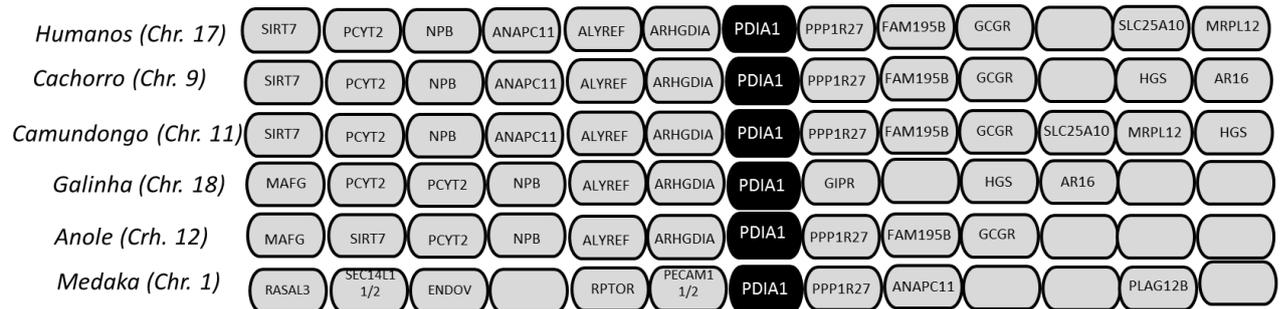
Tabela 5. PDIs e RhoGDIs encontradas no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Localização das PDIs e RhoGDIs no genoma e evidência da macro- mas não microssintenia dos genes PDI e GDI.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EUG1	YDR518W IV:1478608-1480161:
	MPD2	YOL088C XV:153912-154745:-1
	PDI1	YCL043C III:48653-50221:-1
	MPD1	YOR288C XV:852121-853077:-1
	EPS1	YIL005W IX:345692-347797:1
	RDI1	YDL135C IV:218680-219288:-1
	GDI1	YER136W V:439616-440971:1

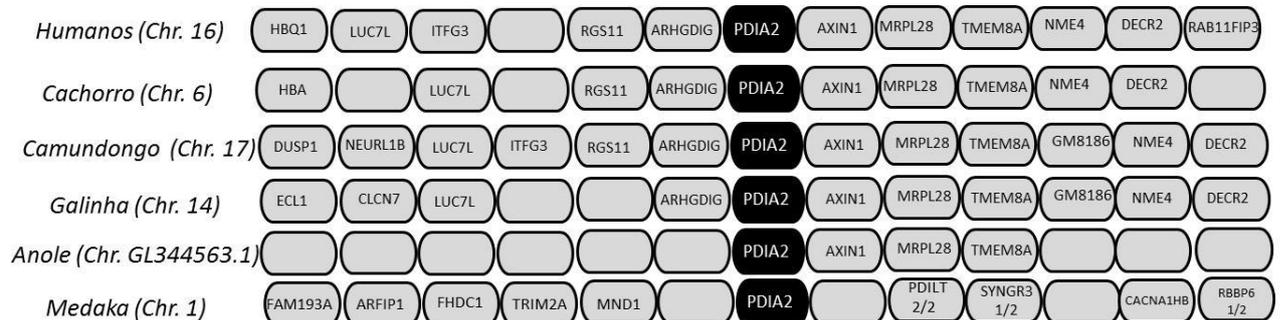
4.3. Análise de blocos sintênicos conservados: microssintenia com genes codificando reguladores da fosfatase proteica-1 (PP1)

Muitos genes microssintênicos estão inseridos em blocos genômicos regulatórios que em si são conservados, mas apresentam genes não relacionados à função do par microssintênico; nestes blocos, os elementos cis-regulatórios do par microssintênico inserem-se em regiões intergênicas conservadas (Irimia M et al, 2013). Estes blocos definem um padrão macrosintênico conservado. Para a presença de blocos genômicos conservados, fizemos um alinhamento dos genes próximos a cada par microssintênico de PDI e RhoGDI. A análise, mostrada nas figuras 5A, 5B, 5C evidenciou blocos especificamente conservados para cada par, porém não entre os distintos pares. Além disso, os blocos mostram alguma heterogeneidade em organismos menos complexos (Figura 5A, 5B, 5C)

A)



B)



C)



Figura 5. Figura representação o bloco de genes que compõem a estrutura genômica de PDIA1, PDIA2 e PDIA8. Os números indicam o ortólogo em cada organismo. A) Bloco de genes sintênicos a PDIA1. B) Bloco de genes sintênicos a PDIA2. C) Bloco de genes sintênicos a PDIA8. Os genes estão alinhados em colunas para ilustrar ortologia. O cromossomo em que o bloco está localizado está representado a esquerda da figura.

A análise da ontogenia dos genes compondo os respectivos pares sintênicos identificou funções bastante variáveis, sem um padrão comum a cada um dos 3 pares sintênicos nessas espécies. No entanto, uma notável exceção foi observada. Os 3 pares sintênicos evidenciaram microssintenia adicional com um terceiro tipo de gene associado à regulação da fosfatase proteica-1 (PP1) (Tabela 6 e figura 6) . Esta microssintenia adicional é bem observada para os pares PDIA1/RhoGDI α e PDIA2/RhoGDI γ , que são adjacentes aos genes PPP1R27 ("protein phosphatase 1 regulator 27", DYSFIP) e AXIN 1 (PPP1R49, um componente da via de sinalização da Wnt). As respectivas distâncias intergênicas desses genes com PDIA1 e PDIA2 são 8,1 e 0,23 kb em humanos. O par PDIA8/RhoGDI β também exhibe microssintenia com o regulador de PP1 WBP11 (PPP1R165, WW domain-binding protein), mas a distância intergênica entre WBP11 e PDIA8 é maior (110,5 kbases), havendo 4 genes interpostos entre eles. Importante, o padrão de conservação dos genes desses reguladores de PP1 é muito forte e semelhante em vários aspectos aos dois pares PDI/RhoGDI descritos acima

Tabela 6. Posição dos genes PDIA1, ARHGDI, PPP1R27, PDIA2, ARHGDIG, AXIN1, PDIA8, ARHGDIB e WBP11 em diferentes representantes evolutivos. Os genes duplicados estão anotados com os números (1/2) e (2/2). A sintenia entre todos os genes estudados é bem estabelecida a partir de anfíbios e conservada até humanos. Todas as informações foram extraídas do Searle Ensembl 2014.

Espécie	PDIA1/ARHGDI/PPP1R27	PDIA2/ARHGDIG/AXIN1	PDIA8/ARHGDIB/WBP11
Medaka	Chr1: 3,834,605-3,846,832-PDIA1 Chr1: 3,678,205-3,686,320-ARHGDI(1/2) Chr1: 3,830,650-3,831,740-PPP1R27 Chr8: 15,809,645-15,815,962-ARHGDI(2/2)	Chr1:24,956,529-24,963,606 – PDIA2 Chr8:7,549,801-7,565,758 (1/2)-AXIN1 Chr8:17,683,617-17,705,923-ARHGDIG Chr1:27,365,607-27,376,461(2/2)-AXIN1	Chr8: 14,884,366-14,891,238-PDIA8 ----ARHGDIB Chr8:20,397,648-20,482,389-WBP11
Platyfish	Scaff JH55674.1: 1,381,682-1,393,778-PDIA1 Scaff JH556748.1: 1,477,912-1,497,986-ARHGDI(1/2) Scaff JH556748.1: 1,395,517-1397,179-PPP1R27 Scaff JH556840.1: 581,680-591,522-ARHGDI (2/2)	ScaffJH557131.1:57,168-71,479-PDIA2 Scaff JH556814.1:1,051,891-1,060,065 – ARHGDIG Scaff 556672.1:3,774,232-3,806,987 – AXIN1 (1/2) Scaff JH557221.1:82,531-108,640-AXIN1 (2/2)	Scaff JH556907.1:374,512-381,943-PDIA8 -----ARHGDIB Scaff JH557102.1: 35,887-43,066-WBP11
Zebrafish	Chr6: 19,682,034-19,706,928 –PDIA1 Chr6: 19,711,330-19,713,431-PPP1R27 Chr3: 60,305,892-60,353,649-ARHGDI Chr3: 60,258,626-60,265,337-PPP1R27	Chr1:9,30,573-9,040,849-PDIA2 Chr3:27,864,729-27,920,351-ARHGDIG Chr3:42,956,131-42,959,881- AXIN1	Chr 6:117,518-119,391-PDIA8 ----ARHGDIB Chr3: 2,088,112-2,097,288-WBP11
Fugu	Scaff 244: 31,623-38,707-PDIA1 Scaff 244: 40,794-41,540-PPP1R27 Scaff 244: 22,539-26,565- ARHGDI (1/2) Scaff 294: 242,253-244,814 – ARHGDI (2/2)	Scaff40:391,877-395,764-PDIA2 Scaff40:1,397,290-1,401,556-AXIN1(2/2) -----ARHGDIG Scaff15:741,375-747,324-AXIN1 (1/2)	----PDIA8 ----ARHGDIB Scaff 65:518,329-522,999
Coelacanth	Scaff JH126596.1: 90,753-126,432-PDIA1 Scaff JH 126596.1: 74,350-85,376-PPP1R27 Scaff JH126596.1: 152,499-175,252-PPP1R27	Scaff JH127264.1:226,688-283,726-PDIA2 Scaff JH127264.1:294,319-425,471-ARGDIG Scaff JH127448.1:621,121-695,680-AXIN1	---PDIA8 Scaff JH 129627.1:90,417-96,015-ARHGDIB Scaff JH12066.1: 675,602-698,942-WBP11

Xenopus	Scaff GL 172918.1: 1,293,250-1,303,208-PDIA1 Scaff GL 172918: 1,354,105-1,361,500-ARHGDI Scaff GL 172918.1: 1,275,311-1,291,416-PPP1R27	Chr14:12,231,749-12,234,668-PDIA2 Chr14:12,199,023-12,229,602-AXIN1 Chr14:12,235,026-12,237,750-ARHGDIG	Scaff GL172795.1: 113,099-120,662-PDIA8 Scaff GL172795.1: 99,550-104,246-ARHGDIB Scaff GL172795.1: 175,509-188,306-WBP11
Anole Lizard	Chr 2: 118,615,571-118,636,37-PDIA1 Chr2: 118,584,879-118,588,892-ARHGDI Chr2: 118,655,076-118,659,001- PPP1R27	ScaffGL344563.1:23,219-26,733-PDIA2 ScaffGL344563.1:15,121-22,363-AXIN1 -----ARHGDIG	Chr5: 27,756,556-27,790,802-PDIA8 Chr5: 27,794,455-27,803,171-ARHGDIB Chr5: 27,656,127-27,673,259-WBP11
Chicken	Chr 18: 10,183,770-10,202,043-PDIA1 Chr 18: 10,205,975-10,214,784-ARHGDI AADN03010811.1: 4,028-5,725-PPP1R27	Chr14:12,231,749-12,234,668-PDIA2 Chr14:12,199,023-12,229,602-AXIN1 Chr14:12,235,026-12,237,750-ARHGDIG	Chr1: 47,853,221-47,871,847-PDIA8 Chr1: 47,844,409-47,852,755-ARHGDIB Chr1: 47,916,130-47,924,400-WBP11
Mouse	Chr 11: 120,560,298-120,573,253-PDIA1 Chr 11: 120,578,104-120,581,624-ARHGDI Chr11: 120,549,979-120,551,132-PPP1R27	Chr17:26,195,99-26,199,087-PDIA2 Chr17:26,138,688-26,195,811-AXIN1 Chr17:26,196,226-26,207,786-ARHGDIG	Chr6: 136,907,311-136,922,180-PDIA8 Chr6: 136,923,523-136,941,899-ARHGDIB Chr6: 136,813,654-136,828,233-WBP11
Human	Chr17: 79,801,035-79,818,570-PDIA1 Chr17: 79,825,597-79,829,282-ARHGDI Chr17: 79,791,368-79,792,926-PPP1R27	Chr16:333,152-337,215-PDIA2 Chr16:337,440-402,673-AXIN1 Chr16:318,726-333,003-ARHGDIG	Chr12: 15,066,969-15,092,016-PDIA8 Chr12: 15,094,951-15,114,662-ARHGDIB Chr12: 14,939,410-14,956,474-WBP11

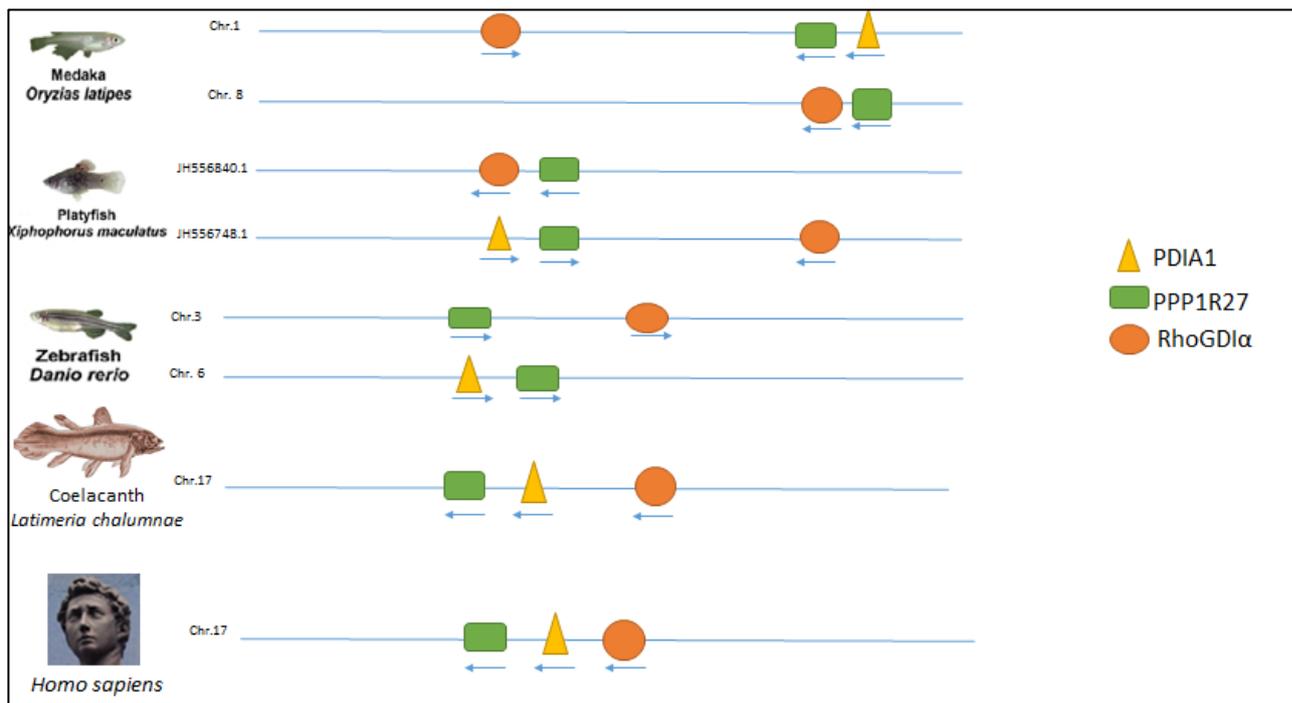


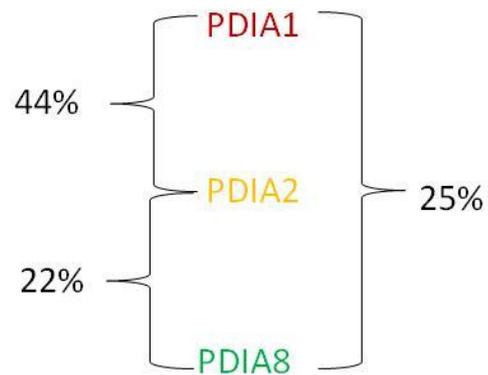
Figura 6. Esquema evolutivo representativo dos diferentes arranjos gênicos entre as proteínas PDIA1, RhoGDI α e PPP1R27 presentes em diferentes organismos. O esquema foi montado com base no posicionamento gênico, e evidencia também a presença de duplicações na RhoGDI e PPP1R27. As setas indicam o sentido da transcrição.

A Tabela 5B e Figura 6 mostram que em peixes ocorre também um padrão incompleto de sintenia também com essas proteínas em relação àquele verificado para anfíbios, répteis, aves e mamíferos. É interessante, por exemplo, que PPP1R27 é duplicada no Medaka e peixe-zebra e é independentemente sintênica a PDI e RhoGDI mesmo nas situações em que estas não são microssintências entre si. Em organismos menos complexos não ocorre uma proximidade aparente entre PDI/RhoGDI e genes de reguladores de fosfatase.

É interessante comentar que a similaridade das sequências proteicas entre as distintas isoformas de RhoGDIs e PDIs envolvidas nos pares sintênicos é no mínimo moderada (figura 7) e estas isoformas guardam uma

arquitetura geral comum, com domínios semelhantes que formam uma família bem determinada. Por outro lado, os reguladores de fosfatase envolvidos na arquitetura sintênica destes genes guardam quase nenhuma homologia e têm inclusive topologias celulares distintas (localização citosólica para PPP1R27 e trans-membranapara AXIN1).

A)



B)

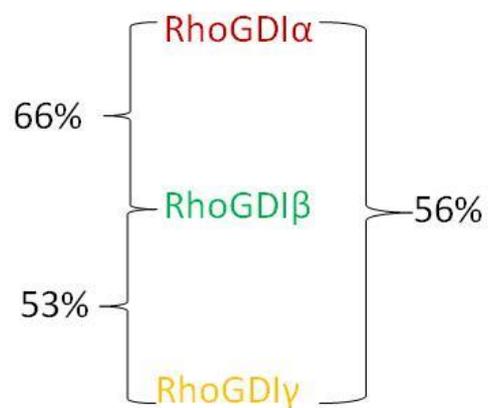


Figura 7. Similaridade das sequências das PDIs e as isoformas do estudo e das RhoGDIs e suas respectivas isoformas.

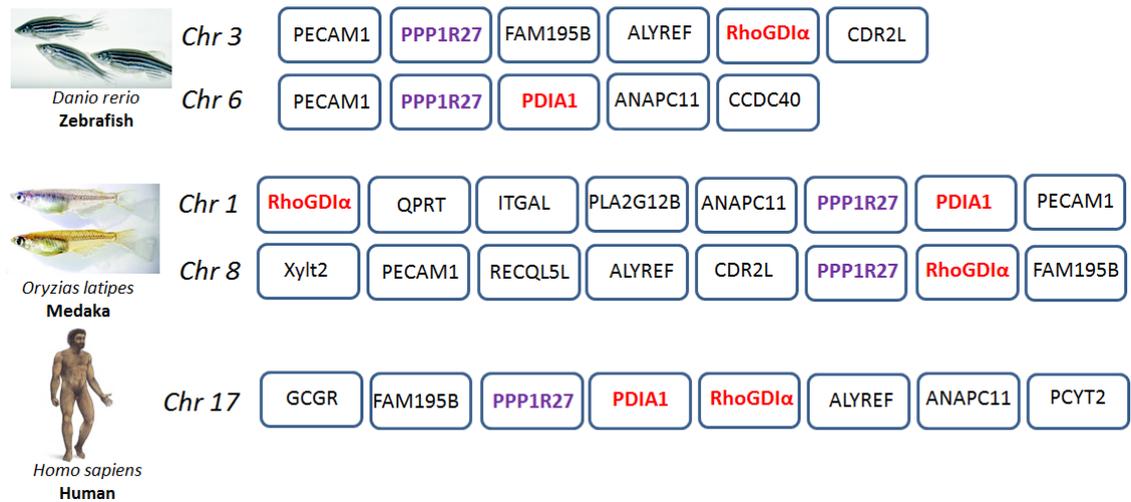


Figure 8. Duplicação da RhoGDIα e PPP1R27 em peixes. comparação do zebrafish, Medaka e Humanos.

4.4. Análise filogenética

A análise filogenética é essencial para o entendimento da história evolutiva da sintenia dos genes de interesse em nosso estudo. Nessa análise, focamos nas árvores evolutivas dos membros das famílias de RhoGDI e PDI envolvidos em nossa investigação. Para inferir e compreender a evolução das proteínas PDIs e RhoGDIs, estabelecemos árvores filogenéticas com base na sequência de aminoácidos.

A família da proteína dissulfeto isomerase é caracterizada pela presença de pelo menos um domínio tiorredoxina (TRX-like), quer seja cataliticamente ativo (a ou a') ou inativo (b ou b'). Estes domínios contêm uma dobra estrutural TRX que tem aminoácidos dispostos numa conformação tridimensional conservada. A dobra estrutural TRX clássica compreende quatro folhas beta antiparalelas circundadas por três alfa-hélices. Enquanto a função enzimática desses domínios não é conservada, a teoria atual propõe que todos os membros da família PDI evoluíram por meio de duplicações de domínios a partir de um ancestral PDI em procariotos que continha um único domínio TRX (McArthur AG, 2001). Embora todas as PDIs de humanos possuam um domínio TRX-like (catalítico ou não), esta continua a ser uma das poucas semelhanças entre estas proteínas, diferindo em seu peso molecular. Na literatura, a árvore

filogenética da família das PDIs de humanos (Petersen DR, 2012) está estabelecida, porém não se reportou até o momento uma árvore filogenética mais apurada da família que inclua outros representantes evolutivos e um método estatístico de confiabilidade (BOOSTRAP). Para a maior compreensão da evolução da família da Proteína Dissulfeto isomerase, estabelecemos uma árvore filogenética (Figura suplementar 1) com todos os membros da família das PDIs em diversos representantes evolutivos. A árvore foi baseada em similaridade de sequências de aminoácidos (denominada assim fenograma) e não foi enraizada. A árvore sem raiz reflete as relações entre os grupos constituintes sem cogitar necessariamente o caminho evolutivo. A maioria dos ramos formados em nossa árvore é condizente com a literatura, porém alguns ramos como da TMX1, TMX2 e TMX3 são mais dispersos e não estão arranjados conforme padrão descrito previamente (McArthur AG, 2001). Outros agrupamentos como os que envolvem CASQ1 e CASQ2, ERP27, PDILT, PDIA1 e PDIA2 são filogeneticamente iguais e possuem um ancestral comum (hipotético e não identificável) a todas elas. Corroborando a hipótese de que estes subconjuntos de genes são filogeneticamente relacionados, um elevado grau de similaridade foi também observado entre algumas proteínas representadas na árvore.

As árvores filogenéticas das proteínas envolvidas na sintenia (Figura 9 e 10) mostram um padrão na organização dos ramos entre cada membro dos pares sintênicos específicos ao nosso estudo (PDIA1 e RhoGDI α , PDIA2 e RhoGDI γ e PDIA8 e RhoGDI β), evidenciando uma possível estrutura modular dessas proteínas. Organização modular é um padrão encontrado em muitos organismos e pode ser definido como a tendência de algumas partes serem mais associadas para aumentar a eficiência das interações num sentido biológico e também facilita forças seletivas sobre rede de interações, por exemplo de proteínas. Pode ser observada em todos os sistemas e ser usada para todas as escalas de organização (interações moleculares até organismo) (Marroig, 2014). É possível que no nosso caso esse arranjo genético/evolutivo reflita de algum modo uma interação das proteínas que esses genes sintênicos codificam. De fato, nossos estudos funcionais identificaram provável interação entre PDIA1 e RhoGDI α pelo método de imunoprecipitação e co-localização à

microscopia confocal, indicando que ambas ocupam o mesmo espaço celular (Figura 24). Além disso, estudos prévios (Pescatore et al, 2012) e projetos em andamento do grupo têm evidenciado fortemente a convergência entre PDI e regulação do citoesqueleto celular mediada por RhoGTPases. Recentemente, obtivemos evidência de interação física *in vitro* entre PDI e Rac1 (dados em andamento, não publicados).

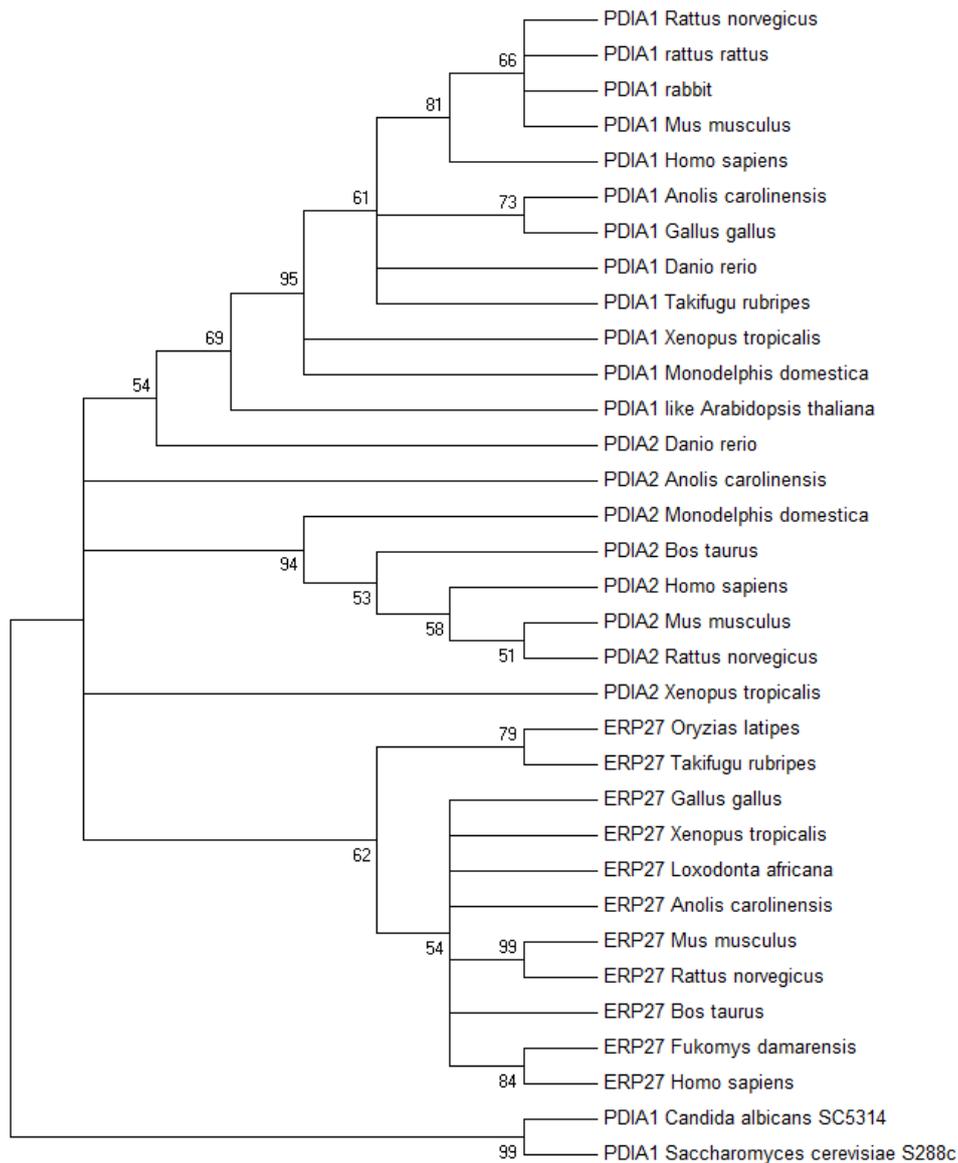


Figura 9. Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. O bootstrap foi de 500 repetições e está mostrado na árvore. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método P-distância. A análise envolveu 33 sequências de aminoácidos. Todas

as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 31 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA6.

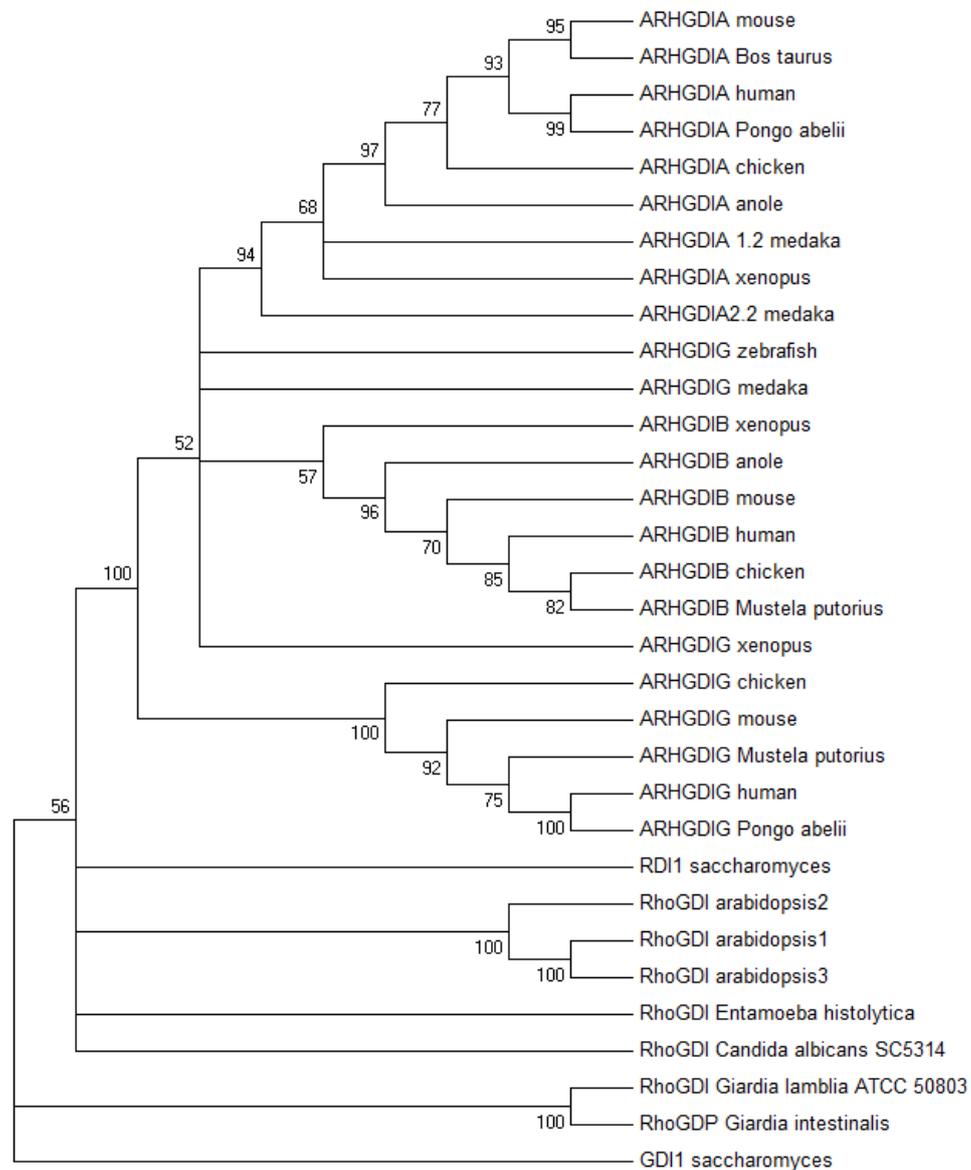


Figura 10. Relações evolutivas de táxons. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. O bootstrap foi de 500 repetições e está mostrado na árvore. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método P-distância. As análises envolveram 32 sequências de aminoácidos. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um

total de 132 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA6.

4.5. História evolutiva: análise da sintenia PDI/RhoGDI em algas e plantas

A análise da origem e a história evolutiva da sintenia abordada neste estudo pode ser significativamente implementada pelo estudo em representantes do reino vegetal. A evolução das plantas ocorreu por meio de níveis de complexidade que foram sucessivamente ganhando novas características, desde os primitivos tapetes de algas (Reino protista), passando pelas briófitas, Pteridófitas (samambaias) e gimnospermas, até as complexas angiospermas da atualidade. A maior parte das análises cladísticas, no ponto em que coincidem em uma dada característica, sugere uma grande complexidade adquirida a cada ramificação, que tende a se originar no predecessor mais complexo. A sintenia entre PDIs e RhoGDIs foi analisada no genoma de *Oriza Sativa* e *Arabidopsis thaliana*, que possuem uma evolução bastante diferenciada do Reino animal, assim como *Chlamydomonas reinhardtii*, uma alga unicelular. O genoma da *Arabidopsis* é composto por cinco cromossomos. Com 125 milhões de pares de bases, o seu genoma é relativamente pequeno, se comparado ao de outras espécies vegetais, o que facilita o seu estudo. Nesta espécie, a sintenia entre PDI e RhoGDI pode ser vista nos cromossomos 1 e 3 (tabela 7 e Figura 11). Em *Oryza sativa*, outro representante das plantas, mas precisamente do grupo das Gimnospermas, a sintenia entre PDI e RhoGDI é observada nos cromossomos 1, 2 e 6. Os ortólogos dessas PDIs e RhoGDIs em eucariotos superiores não podem ser estabelecidos com precisão, mas algumas poucas inferências potenciais com base na similaridade de sequências podem ser sugeridas (Tabela 8). Na alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a análise mostra expressão de genes para ortólogos de PDIs e RhoGDIs, mas nenhum deles tem organização sintênica (Tabela 7).

Em conjunto, estes dados sugerem a possibilidade de uma convergência evolutiva entre o reino animal e vegetal com respeito à organização microssintência dos genes PDI/RhoGDI analisados neste estudo.

Tabela 7. PDIs e RhoGDIs encontradas nos cromossomos de *Chlamydomonas reinhardtii*.

<i>Espécie</i>	<i>Gene</i>	<i>Posição no genoma</i>
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>PDI</i>	DS496114: 1,927,307-1,932,212
	<i>PDI</i>	DS496117: 1,960, 252- 1,966,814
	<i>PDI</i>	DS496108: 2,924,218-2,928,183
	<i>PDI</i>	DS496112: 1,611,180-1,615,570
	<i>PDI</i>	DS496153: 282,185-283,853
	<i>RhoGDI</i>	DS496115; 1258346-1262710

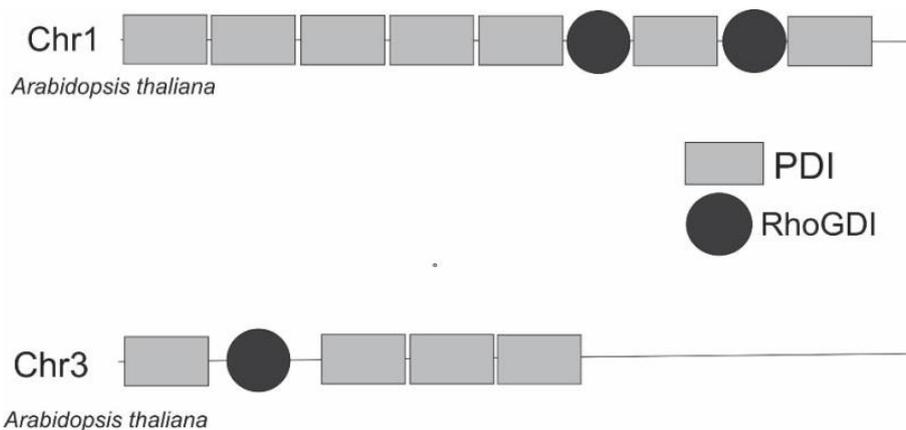


Figura 11. Sintenia entre PDI e RhoGDI em *Arabidopsis thaliana*. A sintenia esta localizada no cromossomo 1 e 3. Os genes da PDI estão representados em cinza e da Rhogdi nos círculos cinza escuro.

Tabela 8. Localização cromossômica das PDIs e RhoGDIs no genoma de *Arabidopsis thaliana*. Para verificar a homologia com a proteína dissulfeto isomerase de humanos, fizemos uma análise “Blast” a fim de localizar o gene correspondente.

Espécie	Gene	Similaridade com genes de Humanos	Posição no genoma
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PDI	Protein disulfide isomerase (PDIA6)	Chr1:1,413,644-1,416,144
	PDI	Protein disulfide isomerase TMX3	Chr1:12,748,571-12,750,383
	PDI	Protein disulfide isomerase PDIA4	Chr1:13,156,368-13,158,467
	PDI	Protein disulfide-isomerase precursor	Chr1:19,460,570-19,463,445
	PDI	Protein disulfide isomerase (PDIA6)	Chr1:2,097,151-2,097,655
	RhoGDI	Rho GDP dissociation	Chr1:23,115,958-23,117,370
	PDI	Protein disulfide-isomerase precursor	Chr1:29,126,650-29,129,612
	RhoGDI	Rho GDP dissociation	Chr1:4,078,913-4,080,106
	PDI	Protein disulfide-isomerase precursor	Chr1:7,645,700-7,648,841
	PDI	Protein disulfide isomerase PDIA6	Chr2:19,483,817-19,483,817
	RhoGDI	Rho GDP dissociation	Chr3:2,513,971-2,515,823
	PDI	Protein disulfide-isomerase precursor	Chr3:20,363,310-20,366,840
	PDI	Protein disulfide isomerase family A, member 3	Chr3:23,123,398-23,123,774
	PDI	Protein disulfide-isomerase precursor	Chr3:5,460,793-5,463,760
	PDI	Thioredoxin domain-containing protein 15 precursor	Chr3:992,128-994,580
	PDI	Protein disulfide-isomerase A4 precursor	Chr4:11,657,008-11,657,008
	PDI	Protein disulfide-isomerase A4 precursor	Chr4:13,589,072-13,593,585
	PDI	Thioredoxin domain-containing protein 15 precursor	Chr4:5,729,192-5,730,850
	PDI	Thioredoxin domain-containing protein 15 precursor	Chr5:5,990,956-5,993,936

4.6. Análise da coexpressão tecidual dos pares sintênicos envolvendo RhoGDIs e PDIs

Um aspecto essencial ao entendimento das implicações das microssintênias observadas em nosso estudo é a investigação da coexpressão tecidual entre os membros dos distintos pares observados. A Tabela 9 mostra os dados de expressão tecido-específica dos genes de PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGDI α , RhoGDI γ e RhoGDI β , bem como dos genes codificando reguladores de PP1 que acompanham estes pares sintênicos. A tabela também informa os cromossomos e os loci gênicos e o sentido de leitura dos genes durante a transcrição. Esta análise de predição mostra com exceção de PDIA2 e PDIA8, os outros genes podem ser considerados de expressão ubíqua. No entanto, considerando as citações de estudos específicos que envolvem as proteínas, existe uma coincidência reportada para os respectivos membros de cada par (Figura 4). Em conjunto, os pares podem ser considerados co-expressos nos respectivos tecidos.

Tabela 9. Predição da localização tecidos em que as proteínas de interesse PDIs (PDIA1, PDIA2 e PDIA8), RhoGDIs (RhoGDI α , β e γ), PPP1R27, AXIN1 e WBP11 são expressos. A tabela também informa os loci gênicos, número dos cromossomos e o sentido de transcrição gênica.

Nome do gene	Genes	Tecido em que é expresso
Protein disulfide Isomerase family A, member 1	PDIA1	Liver, gallbladder, pâncreas, oral mucosa, salivar gland, esophagus, stomach, duodenum, small intestine, apêndice, colon, rectum, kidney, urinary bladder, testis, epididymis, seminal vesicle, breast, vagina, cervix uterine, uterus, fallopian tube, ovary, placenta, adipose tissue, skin, soft tissue, bone marrow, lymph node, tonsil, spleen, cerebral córtex, hippocampus, lateral ventricle, adrenal gland. Nasopharynx, bronchus, lung, heart muscle
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	RhoGDI α	Liver, gallbladder, pâncreas, oral mucosa, salivar gland, esophagus, stomach, duodenum, small intestine, apêndice, colon, rectum, kidney, urinary bladder, testis, epididymis, prostate, seminal vesicle, breast, vagina, cervix uterine, uterus, fallopian tube, ovary, placenta, adipose tissue, skin, skeletal muscle, smooth muscle, soft tissue, bone marrow, lymph node, tonsil, spleen, cerebral córtex, hippocampus,, lateral ventricle, cerebellum, nasopharynx, bronchus, lung, heart muscle.
Proteinphosphatase 1, regulatory subunit 27	PPP1R27	Liver, gallbladder, pâncreas, oral mucosa, salivar gland, esophagus, stomach, small intestine, apêndice, colon, kidney, urinary bladder, testis, epididymus, prostate, seminal vesicle, breast, vagina, cervix uterine, uterus, fallopian tube, placenta, skin, skeletal muscle, soft tissue, bone marrow, tonsil, cerebral córtex, hippocampus, lateral ventricle, parathyroid gland, nasopharynx, bronchus, lung, heart muscle,
Protein disulfide Isomerase family A, member 2	PDIA2	Pancreas, stomach, duodenum, small intestine.

<p>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma</p>	<p>RhoGDI-γ</p>	<p>Liver, gallbladder, pâncreas, oral mucosa, salivar gland, esophagus, stomach, duodenum, small intestine, appendix, colon, rectum, kidney, urinary bladder, testis, epididymis, prostate, seminal vesicle, breast, cervix uterine, uterus, fallopian tube, placenta, skin, skeletal muscle, soft tissue, lymph node, tonsil, spleen, cerebral córtex, hippocampus, parathyroid gland, adrenal gland, nasopharynx, bronchus, lung, heart muscle.</p> <p>Liver, gallbladder, pâncreas, oral mucosa, salivar gland, esophagus, stomach, duodenum, small intestine, appendix, colon, rectum, kidney, urinary bladder, testis, epididymis, prostate, seminal vesicle, breast, vagina, cervix uterine, uterus, fallopian tube, ovary, placenta, adipose tissue, skin, skeletal muscle, soft muscle, bone marrow, lymph node, tonsil, spleen, cerebral córtex, hippocampus, lateral ventricle, cerebellum, adrenal gland, nasopharynx, bronchus, lung, heart muscle.</p>
<p>Axin1</p>	<p>AXIN1</p>	<p>Pâncreas, stomach, kidney</p>
<p>Protein disulfide Isomerase family A, member 8</p>	<p>PDIA8 (Erp27)</p>	<p>Pâncreas, stomach, kidney</p>
<p>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta</p>	<p>RhoGDI-β</p>	<p>Salivar gland, appendix, colon, kidney, urinary bladder, placenta, adipose tissue, skin, soft tissue, bone marrow, lymph node, tonsil, spleen, cerebral córtex, hippocampus, lateral ventricle, cerebellum, lung</p>
<p>WW domain binding protein 11</p>	<p>WBP11</p>	<p>Liver, gallbladder, pâncreas, oral mucosa, salivar gland, esophagus, stomach, duodenum, small intestine, appendix, colon, rectum, kidney, urinary bladder, testis, epididymis, prostate, seminal vesicle, breast, vagina, cervix uterine, uterus, fallopian tube, ovary, placenta, adipose tissue, skin, smooth muscle, soft tissue, bone marrow, lymph node, tonsil, spleen, cerebral córtex, hippocampus, lateral ventricle, thyroid gland, parathyroid gland, nasopharynx, bronchus, lung, heart muscle</p>

4.7. Predição dos sítios de ligação a fatores de transcrição que podem regular os pares sintênicos

Um dos aspectos inerentes a genes microssintênicos é a potencial co-regulação, que implica em respostas coordenadas a estímulos diversos, codificadas por regulação trans via mecanismos que incluem fatores de transcrição. Assim, a análise global dos sítios de ligação a fatores de transcrição, que se tornou possível graças ao estudo ENCODE, pode fornecer várias informações: 1) Existência de sítios comuns entre os distintos pares sintênicos; 2) Ontologia Gênica dos fatores identificados nesta análise, que pode indicar funções primordiais do arranjo sintênico construído evolutivamente (tabela 10 e 11). A análise dos fatores de transcrição encontrados foi realizada pela bases de dados do panther (<http://pantherdb.org/>) programa. Em conjunto, a análise da ontologia destes fatores indica principalmente associação com processos de sinalização associados a desenvolvimento, metabolismo e resposta imune.

Tabela 10. Fatores de transcrição preditos pelo Projeto ENCODE que estão associados a PDIs e RhoGDIs de humanos.

Fatores de transcrição identificados pelos seus sítios de ligação a regiões vizinhas aos genes sintênicos(Projeto Encode)

POLR2A,FOS,SPI,FOS,POLR2A,MAS,E2F1,TAF1,CHD2,PML,ELK4,MXI,TBP,TAF1,MYC,NRF1,MTA3,CTCF,REST,GABPA,CTCF,CTC
F,MXI1,EGR1,SPI1,MAS,MYBL2,MAX,TAF1,REST,MYC,CHD1,RUNX3,EGR1,TFAP2C,SAP30,TFAP2A,CHD2,JUND,CCNT2,E2F6,ELF1,
ETS1,EGR1,TCF7L2,SPI1,ZBTB7A,SIN3AK20,ELK1,CCNT2,KDM5B,GIF2F1,BCL3,STAT3,STAT1,CEBPD,NR2C2,EP300,ZNF274,ELF1,
TCF12,CTCF,USF2,SP1,CREB1,MAX,PBX3,RELA,REST,NR3C1,SIN3A,FOXA1,RFX5,MYC,NRF1,BHLHE40,E2F4,SPI1,PAX5,SIX5,ETS
1,JUN,YY1,ATF3,HDAC1,FOXP2,PHF8,ZNF143,RCOR1,BRCA1,POU2F2,RBBP5,HDAC2,RUNX3,BACH1,TCF3,TBL1XR1,MYBL2,FOX
M1,HDAC8,STAT5A,NFATC1,MYC,ELF1,TAF1,ELF1,TAF1,MAX,YY1,MAS,FOSL2,ETS1,E2F6,TAL1,EP300,CTCF,EGR1,PBX3,MAS,MYC,
MAX,YY1,EBF1,PBX3,TCF3,ELF1,NR3C1,JUND,MAX,MAS,TEAD4,CHD2,SIX5,PBX3,NFIC,MYBL2,HMG3,HDAC6,E2F6,CHD2,TEAD4,
UBTF,NR3C1,GABPA,EGR1,GATA2,NR2F2,NFIC,ZBTB7A,RUNX3,PAX5,ZBTB33,BCL3,SIN3AK20,POU2F2,ZNF143,HDAC1,CREB1,RA
D21,SMC3,NR3C1,USF1,CHD1,MXI1,BHLHE40,HNF4A,SMARCB1,ATF2,CHD2,MTA3,PBX3,BCL3,NFATC1,POU2F2,EBF1,WRNIP1,PM
L,ETS1,PBX3,SIN3AK20,BCL3,CTCF,CHD2,RUNX3,HMG3,STAT5A,KDM5B,POU2F2,GABP2,CCNT2,NR3C1,FOXP2,SIN3AK20,SMAR
CB1,ZNF263,BCL3,REST,EP300,ZBTB33,NR2F2,TFAP2A,TFAP2C,PPARGC1A,FOXA2,FOSL2,FOXA1,SIN3AK20,FOSL2,CCNT2,POU2
F2,SIN3AK20,JUND,ZBTB7A,CEBPP,RCOR1,CTCF,MYC,RAD21,CTCF,EBF1,POLR2A,HNF4G,FOS,MTA3,PBX3,TCF3,G1LK,WRNIP1,
EBF1,SRF,NFIC,PML,NRF1,JUN,POLR2A,CEBPB,GATA1,MAX,RCOR,ENF263,SPI1,TEAD4,CEBPB,GATA2,CHD1,TBP,WRNIP1,ETS1,
SMARCC1,SIN3AK20,SAP30,HDAC1,RBBP5,SMARCB1,ZBTB7A,RDBP,STAT1,PML,TAF1,SIN3AK20,MYC,KDM5B,TAF7,HDAC2,POU2
F2,REST,CTCF,ZBTB33,TBP,MAS,MAX,FOXP2,GTF2F1,TCF3,PAX5,TAL1,ETS1,GTF2F1,TCF3,PAX5,TAL1,ETS1,GTF2B,EGR1,RELA,
TCF12,CEBPD,JUND,EXH2,IRF1,MXI1,ENF263,E2F6,GABPA,E2F4,TCF7L2,NFYA,NFYB,E2F1,NRF1,USF1,RFX5,ATF3,NR2C2,CCNT2,
ATF2,SREBP1,ELF1,THAP1,CHD2,TEAD4,MAFK,SIX5,IRF3,YY1,PBX3,MAX,CTCF,REST,FOXM1,ELK4,ATF1,BRCA1,MXI1,ETS1,SPI1,
RF4,NRF1,RBBP5,EP300,RCOR1,USF2,ELK1,FOXP2,BATF,SIN3A,HNF4A,JUNB,KDM5B,BHLHE40,TAF1,CREB1,JUND,CEBPB,SIN3A
K20,SAP30,CEBPB,SIN3AK20,SAP30,CEBPB,RELA,AGR1,HDAC1,CCNT2,TAF7,TCF12,RUNX3,POU2F2,BACH1,ZBTB7A,NR3CA,CHD
2,TCF3,CTCF,KDM5A,CHD1,PAX5,CEBPB,TCF12,WRNIP1,POLR2F,TFAP2C,POLR2A,TFAP2A,CTCF,RAD21,SMC3,GABPA,POLR2A,P
OLR2A,POLR2A,POLR2A,CEBPB,TAF1,CCNT2,POLR2,FOXA2,MAX,MYC,FOXA1,POLR2A

Chr 17: 9,799,477-79,834,498
PDI1XRhoGdi

PDIA2XRHOGDIY
Chr16: 329,510-338,699

EZH2,ZBTB7A,BHLHE40,YY1,EZH2,E2F6,PHF8,MAX,BHLHE40,RUNX3,PAX5,CTCF,RAD21,ZNF263

PDIA8XRHOGDI8
Chr12: 15,062,576-15117,673

TBP,FOXMI1,FOSL2,IRF4,MYC,FOSL2,MAX,JUN,TBP,RELA,SP1,JUND,MXI1,BATF,POLR2A,RUNX3,SIN3AK20,CHD1,TFAP2C,TFAP2A,RUNX3,STAT3CTCF,ELF1,FOS,EP300,POLR2A,PML,TAF1,YY1,GATA1,NFIC,TBP,ELK1,NFATC1,GATA2,ATF2,CEBPB,SIN3AK20,SPI1,BCLAF1,MXI1,REST,RUNX3,CHD2,EGR1,BHLHE40,IRF4,MYC,MAX,GATA3,SIN3AK20,BCL3,E2F6,FOXP2,PPX3,POUPF2,ATF1,FOS,NFIC,SIN3AK20,JUND,POLR2A,PAX5,BHLHE40,MXI1,USF2,USF1,TBP,WRNIP1,MAX,USF1,RELA,EP300,POLR2A,RUNX3,ATF2,NFATC1,SPI1,ZNF143,EBF1,MXI1,MEF2A,BCL11A,NFIC,BATF,TBP,POU2F2,EP300,WRNIP1,POLR2A,MYC,TBP,PML,TCF12,SIN3,FOS,XI1,MAFK,ELF1,FOXMI1,SPI1,CTCF,JUN,CEBPB,POLR2A,STAT3,FOSL2,RAD21,SIN3AK20,FOXP2,EBF1,WRNIP1,STAT3,NFYB,PML,YY1,POLR2A,CHD1,MTA3,PBX3,ATF2,REST,NFIC,TFAP2C,JUN,BATF,FOS,MEF2A,MEF2C,MXI1,YY1,TAF1,MAFF,POLR2A,NFATC1,BCLA F1,RUNX3,RELA,SPI1,FOS,TBP,POU2F2,PML,MAX,BCL3,PAX5,BHLHE40,ELF1,IRF4,MYC,BCL11A,ELK1,MEF2A,BATF,ATF2,SPI1,SR F,FOXMI1,NFIC,CTCF,RAD21

Tabela 11. Fatores de transcrição preditos pelo Projeto ENCODE que estão associados a PDIs e RhoGDIs e são conservados em humanos, ratos e camundongos.

Predição dos sítios de ligação a fatores de transcrição - HMR (Projeto Encode)

PDIA1xRhoGDI α YY1,AHRARNT,MYOD,GRE,TAL1BETAE,RREB,PPARA,AHRARNT,ELK1,PAX5,NFY,AP2,COMP1,EVI1,LMO2COM,
Chr 17: 79,799,477-79,834,498 GATA1, MYB,TCF11MAFG,COMP1,HTF,COMP1,HTF,CPMP1,HOX13,NHNF1, PS3.

PDIA2xRHOGDI γ PAX4,MAZR,OLF1,MYOD,GRE,PAX2,ROAZ,CDPCR3,OLF1,PAX3,MYCMAX,
Chr16: 329,510-338,699 NRSF,GATA3,GATA1

PDIA8xRHOGDI β TGIF,MEF2,HAND1E47,RFX1,SRF,BRACH,HFH3,BACH1,FOX04,FOX03,FOX01,
Chr12: 15,062,576-15117,673 COUP,SEF1,LUN1,AP1FJ,MRF2,FREAC,HFH3,HFH1,STAT,OCT,FREAC,STAT5B

A ontogenia gênica dos fatores de transcrição correspondentes aos sítios de ligação encontrados na análise dos fatores conservados em humanos, ratos e camundongos foi investigada e está mostrada nos gráficos das Figuras 12, 13 e 14.

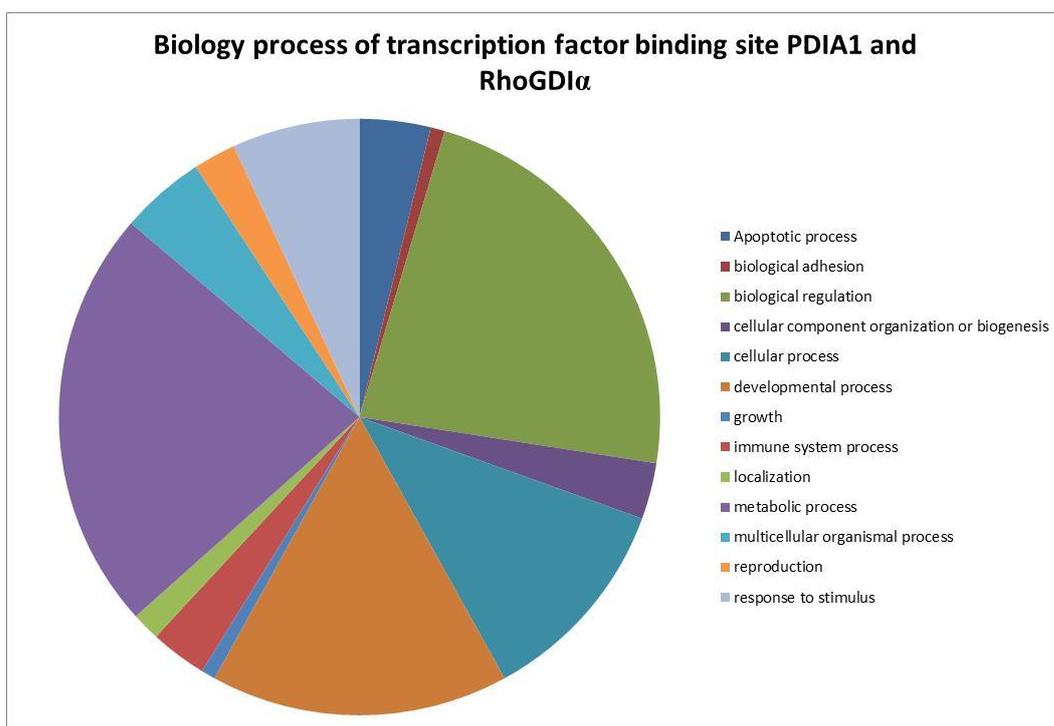


Figura 12. Processos biológicos associados aos fatores de transcrição identificados pelos sítios de ligação às regiões vizinhas aos genes de PDIA1 e RhoGDI α .

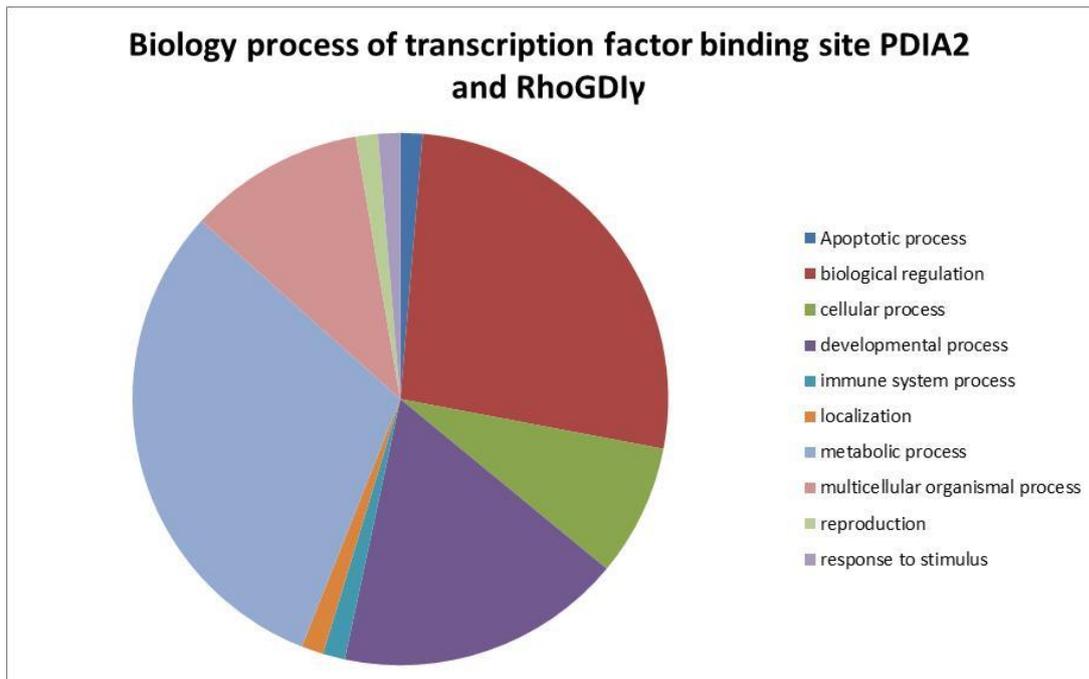


Figura 13. Processos biológicos associados aos fatores de transcrição identificados pelos sítios de ligação às regiões vizinhas aos genes de PDIA2 e RhoGDI γ .

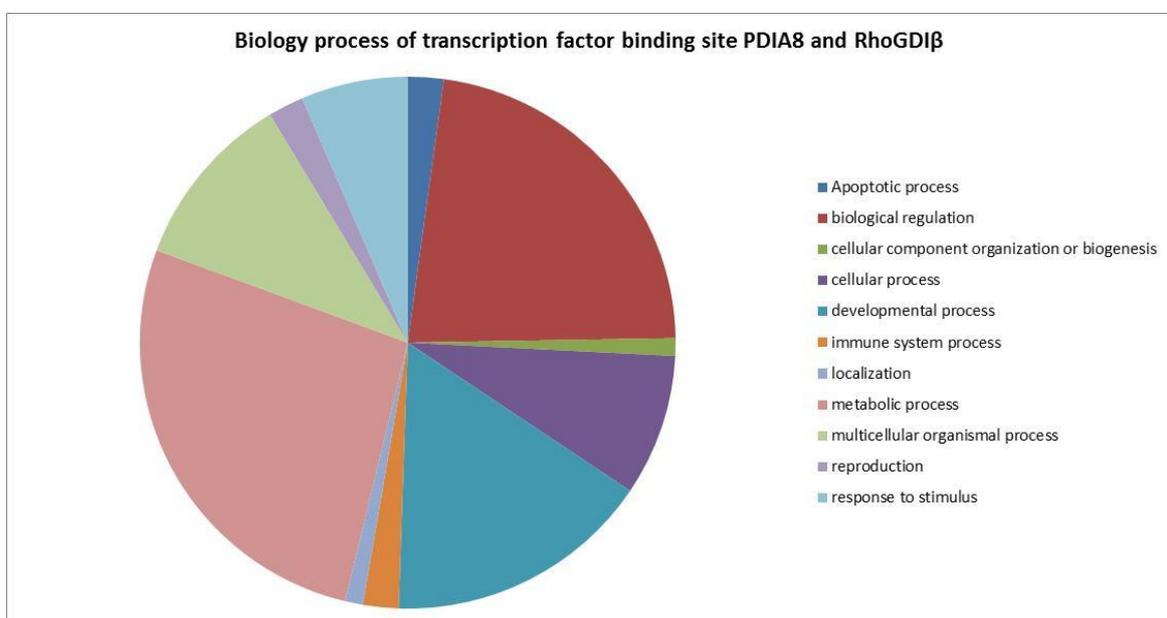


Figura 14. Processos biológicos associados aos fatores de transcrição identificados pelos sítios de ligação às regiões vizinhas aos genes de PDIA8 e RhoGDI β .

4.8. Implicações funcionais: expressão combinada de proteínas dos pares sintênicos

O conjunto de dados discutidos até o momento indica que genes de PDIs e RhoGDIs têm convergência importante e o padrão observado indica um processo coerente, evolutivamente conservado, que claramente não parece representar uma ocorrência casual e aparentemente proporcionou vantagens evolutivas definidas. Deste modo, realizamos experimentos para confirmar e ampliar o entendimento das implicações funcionais entre os genes de PDIs e RhoGDIs.

Inicialmente, verificamos se angiotensina II ou LPS poderiam induzir a transcrição das RhoGDIs α , β e γ em HUVEC e monócitos THP-1 (Figura 15). Não foram observadas variações importantes na expressão gênica de nenhum dos alvos estudados.

Em seguida, investigamos se mudanças de expressão de uma das proteínas envolvidas acarreta alterações na expressão da outra proteína (no caso, RhoGDI α) (Figura 16). A superexpressão aguda (por 24 hs) de PDIA1, PDIA8 ou RhoGDI γ em células HEK 293 não induziu, respectivamente, mudanças de expressão de RhoGDI α , RhoGDI β e PDIA2 (Figura 16, 17 e 18). Experimentos recentes utilizando expressão induzível por doxíciclina em células musculares lisas transfectadas com vetor lentiviral codificando para PDIA1 não mostraram também alterações significativas de RhoGDI α (dados não mostrados).

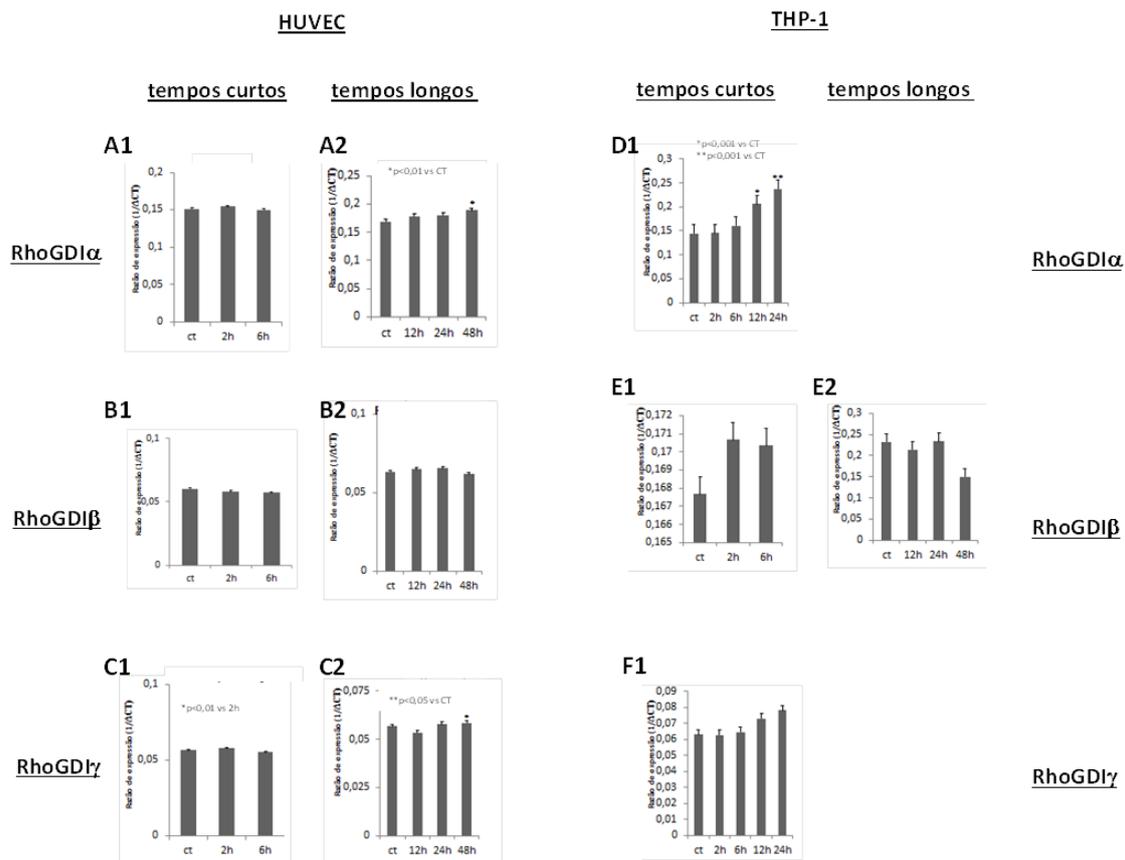


Figura 15. Expressão gênica das RhoGDIs α , β e γ induzidas por ANGII em células endoteliais e por LPS em monócitos. Cinética da expressão gênica das RhoGDIs α , β e γ analisadas por real time PCR em células HUVEC estimuladas com ANGII (A-C) e em THP-1 estimulada com LPS (D-F). Em (A e D) RhoGDI α , (B e D) RhoGDI β e (C e F) RhoGDI γ . Os gráficos mostram média erro padrão da média, $p < 0,05$ é considerado significativo.

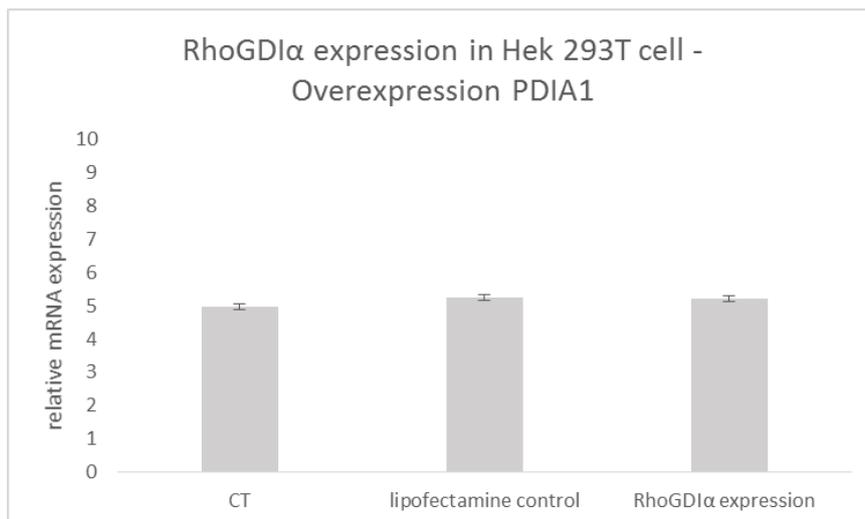


Figura 16. Expressão da RhoGDI α em células Hek293T 24 hs após superexpressão da PDIA1. A extração do mRNA foi feita 24h após a transfecção.

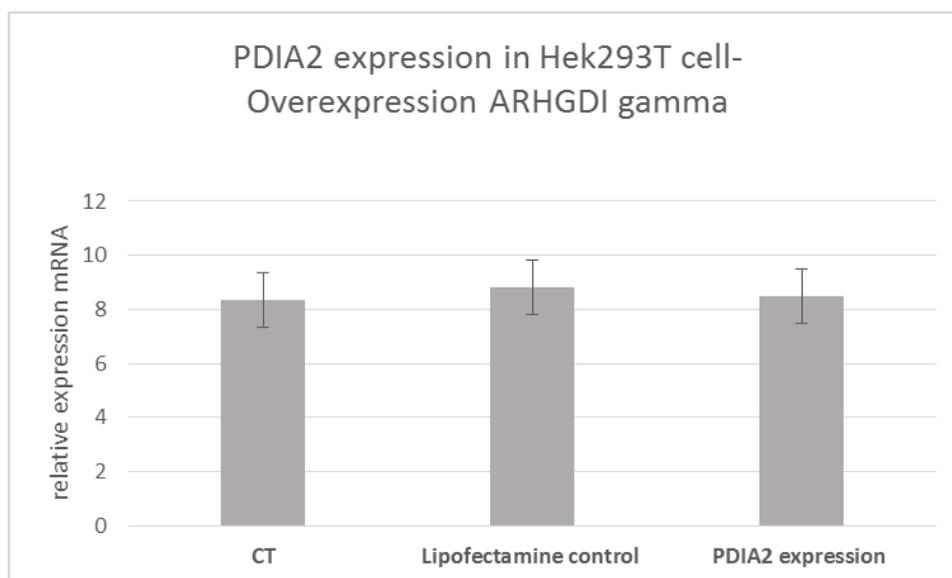


Figura 17. Expressão da PDIA2 em células Hek293T super-expressadas com RhoGDI γ . A extração do mRNA foi feita 24h após a transfecção.

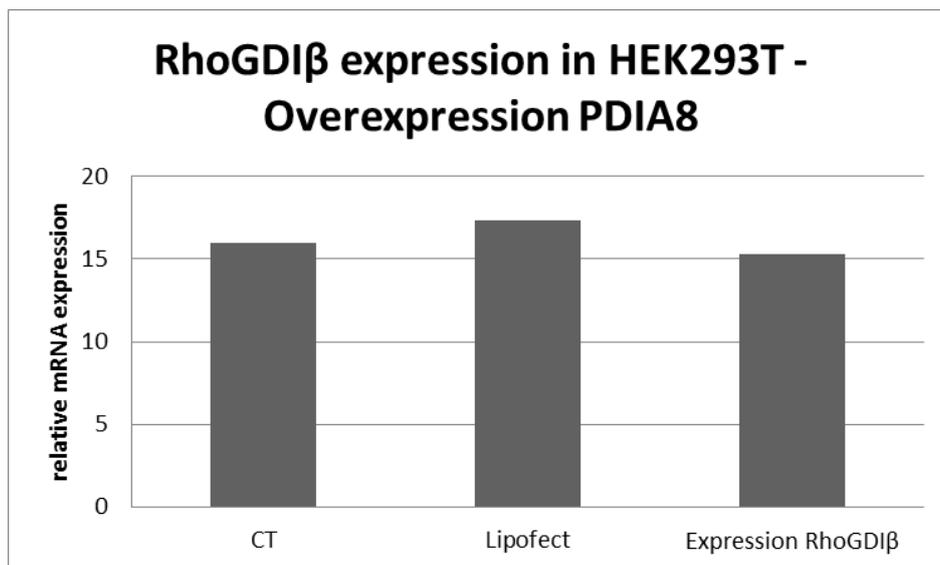


Figura 18. Expressão da RhoGDI β em células Hek293T super-expressadas com PDIA8. A extração do mRNA foi feita 24h após a transfecção.

Para investigar se a expressão forçada de PPP1R27 influencia a expressão gênica e proteica de PDIA1 e RhoGDI α , realizamos super-expressão aguda da PPP1R27 via transfecção plasmideal, em células HUVEC (figuras 19 e 20). Estas células não possuem expressão basal detectável de PPP1R27. A proteína não é detectada em sua forma monomérica. As células foram coletadas 24 horas após a transfecção e não foram tratadas. Vemos na figura 19, a expressão gênica de PDIA1 (Figura 18A), RhoGDI (Figura. 19B) e do housekeeping GAPDH (Figura 19C), observamos que a superexpressão de PPP1R27 promove aumento na expressão gênica dos três genes. Infelizmente, não pudemos realizar os cálculos de variação da expressão gênica, pois houve variação no housekeeping. Embora não tenhamos observado variações na expressão de PDIA1 e RhoGDI α nestas células, não descartamos as seguintes hipóteses: 1) existe a manutenção de um nível basal destas proteínas (PDI e GDI são housekeepings, constitutivamente expressos) e portanto não conseguimos observar variações por serem pequenas demais, ou não existirem; 2) a expressão não varia devido ao tipo celular específico, 3) o gene sofre algum tipo de regulação epigenética (metilação) após a especialização

celular e mantém uma proteína de meia vida longa e cujas alterações transcricionais poderão ser inexistentes, ínfimas e/ ou extremamente específicas; 4) com meia vida longa, a indução de sua expressão depende de sua prévia degradação; 5) manutenção de um RNA estável. Lembramos ainda que estudos sobre a regulação transcricional da PDI, GDI e PPP1R27 são escassos e/ou inexistentes.

Embora esteja claro que a tríade PDIA1/RhoGDI α /PPP1R27 possa ser co-regulada, não pudemos confirmar tal hipótese de modo funcional. Contudo é importante salientar que esta tríade pode funcionar em circuitos celulares específicos, modulando a ativação e desativação de repostas celulares up e downstream dentro destes circuitos de forma extremamente fina. A manutenção da presença da PPP1R27 ao lado de PDI e GDI, sugere uma relação de dependência funcional, e possivelmente também gênica entre elas. Em evolução, a manutenção de certos padrões geralmente está ligada a tarefas celulares essenciais que há milhares de anos podem ter garantido a sobrevivência e/ou melhor adaptação de uma espécie a mudanças metabólicas, climáticas e ambientais.

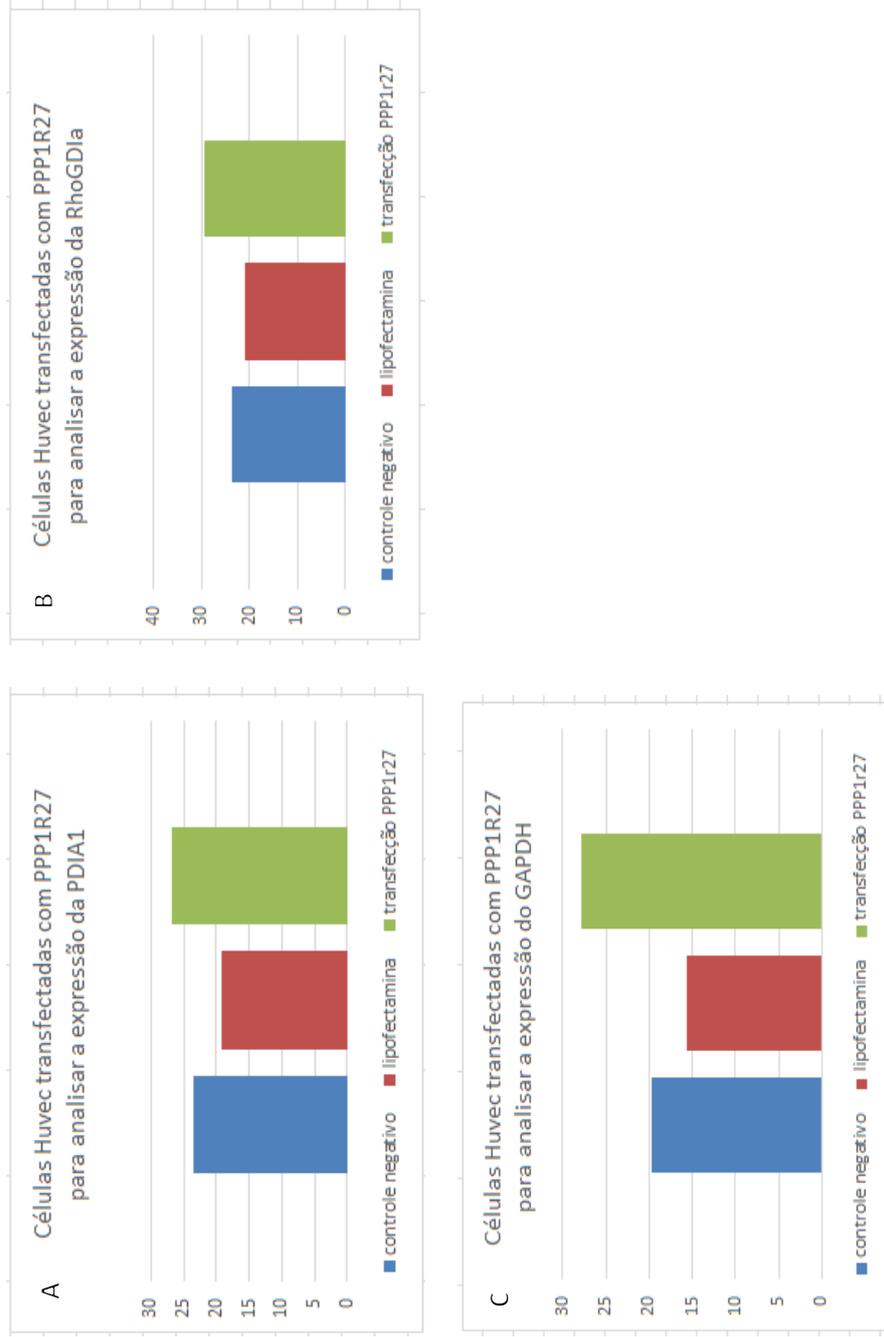


Figura 19: Expressão gênica de PDIA1 (A), RhoGDIa (B) e do housekeeping GAPDH (C) mediadas pela superexpressão de PPP1R27 em células endoteliais. A análise dos genes foi realizada por RT-PCR. Experimentos realizados em duplicata com n=3 por grupo.

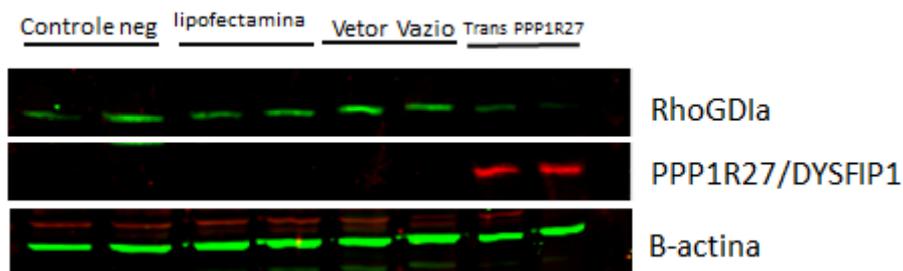


Figura 20: Expressão protéica de PDIA1 e RhoGDI α mediadas pela superexpressão de PPP1R27 em células endoteliais. A análise das proteínas foi realizada pela técnica de western blotting. Experimentos realizados em duplicata.

4.9. Estímulos que podem co-modificar a expressão de PDIA1 e RhoGDI α em células HUVEC

Para o estudo de co-regulação transcricional, é importante identificar estímulos fisiológicos que sejam capazes de alterar de modo previsível a expressão dos genes de PDIs e RhoGDIs de interesse. Embora a hipótese mais provável seja a de uma co-regulação positiva, isto é, expressão co-estimulada, não podemos deixar de considerar a possibilidade de co-regulação inversa, i.e. aumento de um gene e repressão do outro.

A célula usada no estudo da região promotora dos pares sintênicos PDIA1 e RhoGDI α é a célula endotelial humana da linhagem HUVEC - *Human umbilical vein endothelial cell*. Para confirmar se a célula é ideal para o estudo, fizemos uma RT-PCR para confirmar a expressão de todos os mRNAs dos pares sintênicos das PDIs e RhoGDIs. Também investigamos a expressão protéica de PDIA1 e RhoGDI α por Western blot (Figura 21) com anticorpos específicos.

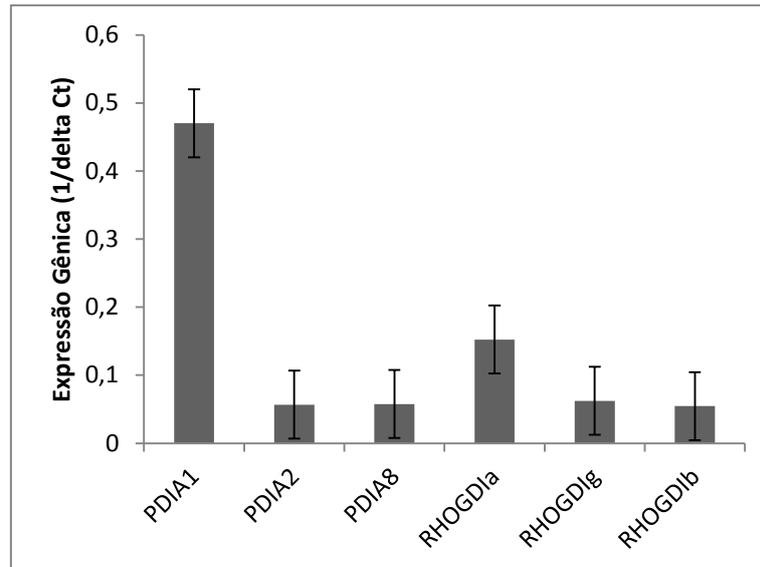


Figura 21. Expressão gênica da PDIA1, PDIA2, PDIA8, RhoGD1 α , RhoGD1 γ e RhoGD1 β em células Huvec.

A Figura 22 mostra expressão constitutiva basal de todas as proteínas de interesse em nosso estudo.

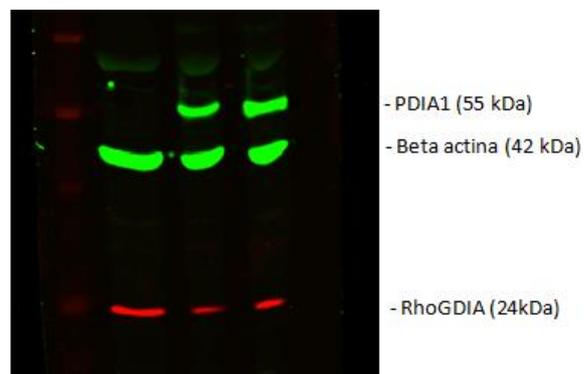


Figura 22. Expressão protéica de PDIA1 e RhoGD1 α em células endoteliais humanas da linhagem HUVEC.

4.10. Análises in vitro da interação entre PDIA1 e RhoGD1 α

A sintonia de genes frequentemente tem implicância na convergência funcional e interação física das respectivas proteínas envolvidas. Para saber se

PDI e RhoGDIs interagem fisicamente, foi investigada a associação destas proteínas por co - imunoprecipitação (Co - IP) no lisado total de células endoteliais humanas (HUVEC). Nosso foco foi no par PDIA1 e RhoGDI α , fizemos a Co-IP para RhoGDI α e Western blot para PDIA1. O experimento foi repetido três vezes e para cada cada experimento, utilizamos duas amostras de diferentes lisados, confirmando a interação física entre PDIA1 e RhoGDI α (Figura 23).

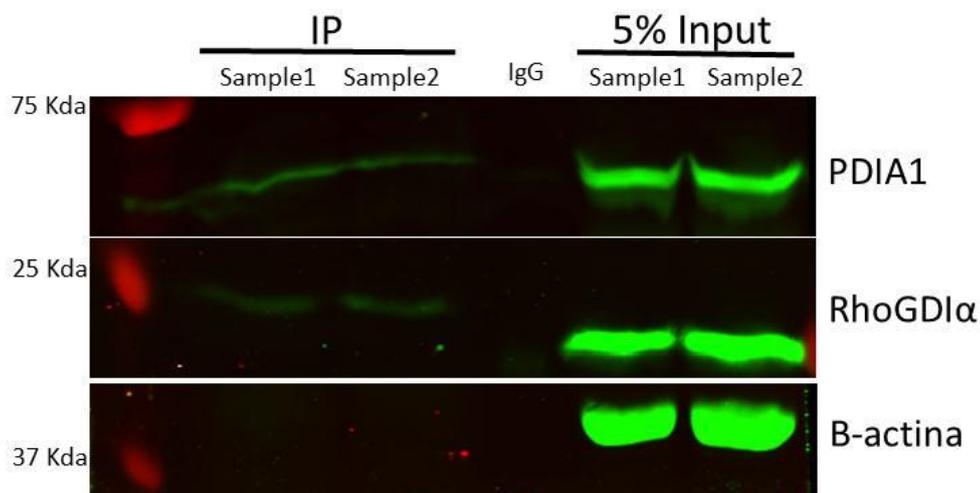


Figura 23. Interação física entre RhoGDI α e PDIA1 em células HUVEC no estado basal. Imunoprecipitação da RhoGDI seguido por Western blot da PDIA1. O experimento foi repetido 3 vezes.

Para entender o padrão de expressão das proteínas PDIA1 e RhoGDI α , utilizamos as células musculares lisas vasculares (VSMC) de camundongos transgênicos que super-expressam a PDIA1. Não é possível observar mudanças no padrão de expressão da proteína RhoGDI α nas células que super-expressam PDIA1 (Figura 24). Em células endoteliais HUVEC, nem a superepressão de PDIA1 e nem seu silenciamento causam variações na expressão protéica de RhoGDI α (Moretti et al, dados não publicados)

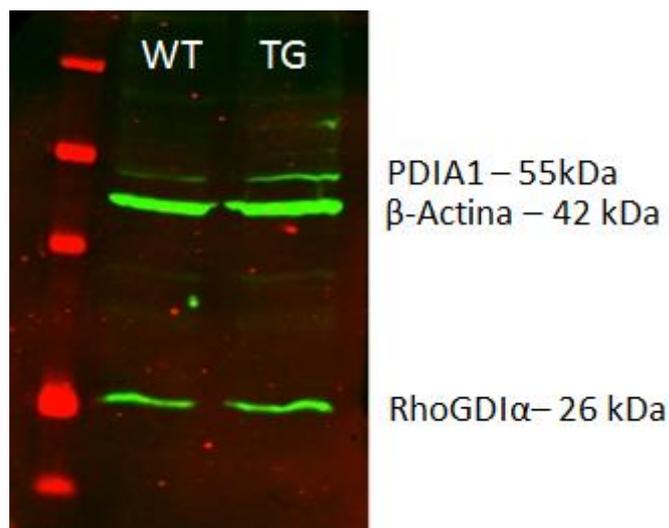


Figura 24. Expressão da RhoGDI α nas células dos animais transgênicos que super-expressam a PDIA1.

A microscopia confocal para o par sintênico PDIA1 e RhoGDI α em células HUVEC no estado basal, mostrou correlação significativa com coeficientes de Pearson de até 88%. Nós repetimos essa experiência com três anticorpos diferentes para PDIA1 e com dois anticorpos diferentes para RhoGDI α . A co-localização ocorreu para todos os pares de anticorpos (Figura 25).

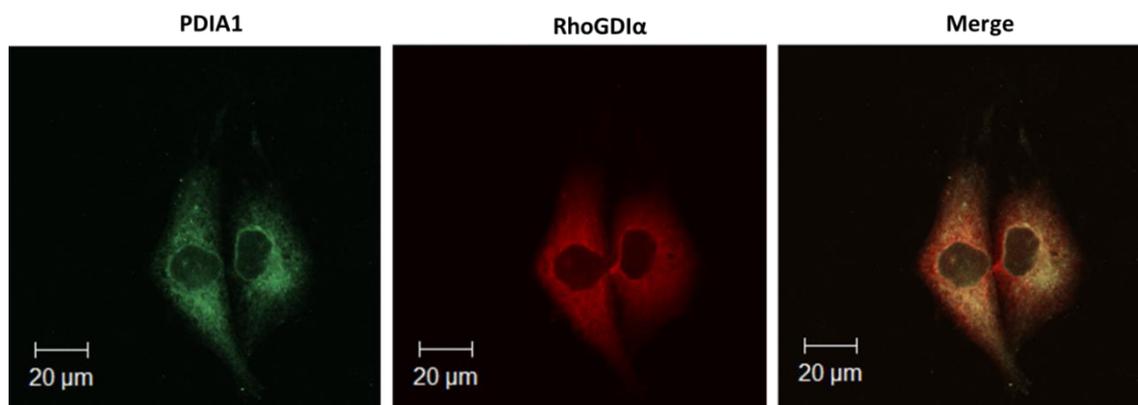


Figura 25. Microscopia confocal para o par sintênico PDIA1 e RhoGDI α em células HUVEC em seu estado basal mostrou correlação significativa com coeficientes de Pearson de até 88%.

5. Discussão

5. Discussão

O principal foco deste estudo foi o entendimento de como o padrão de arranjos microssintênicos entre os genes poderia ajudar a sedimentar as bases da interação entre membros da família das PDIs e RhoGDIs. Nossos resultados mostram um padrão de microssintenia específico para cada isoforma extremamente conservado. Isto é, microssintenia ocorre não apenas para PDIA1 e RhoGDI α (no cromossomo 17 em humanos), mas também para outras isoformas da RhoGDI e da família da PDI nos cromossomos 12 e 16 e com organizações bastante similares em outras espécies. Estes pares microssintênicos estão inseridos em grandes blocos genômicos regulatórios conservados, porém cada par apresenta um diferente conjunto de genes, com identidades e funções distintas. Como exceção, entretanto, esta análise evidenciou que cada par microssintênico PDI/GDI é também microssintênico a um gene codificando um inibidor de fosfatase proteica-1 (PP1). Assim, os dados indicam uma tríade microssintênica conservada em que cada isoforma de RhoGDI é microssintênica a um membro da família da PDI e um inibidor de PP1. No entanto, enquanto as isoformas de RhoGDI e PDI guardam homologia significativa entre si, os inibidores de PP1 têm estruturas e localizações subcelulares bastante distintas. A análise evolutiva indicou que o padrão conservado completo (i.e., os 3 pares) da microssintenia estabeleceu-se de modo uniforme a partir de anfíbios e inclui répteis, aves e mamíferos. Em peixes, o padrão de microssintenia é irregular ou incompleto: a isoforma RhoGDI β é ausente, em alguns casos não ocorre sintenia (peixe-zebra) e em outros casos a microssintenia ocorre apenas para o par PDIA1/RhoGDI α mas não para o par PDIA2/RhoGDI γ . Alguns peixes apresentam duplicação do gene da RhoGDI α , com um dos genes sintênicos à PDIA1 e outro distante; houve também duplicações não coincidentes de genes do regulador de PP1. No peixe celacanto, um precursor de tetrápodos terrestres, existe microssintenia bem estabelecida entre os pares PDIA1/RhoGDI α e PDIA2/RhoGDI γ . Em organismos menos complexos, observamos microssintenia de 1 par de genes PDI/RhoGDI em *C.elegans*, enquanto

cnidários e leveduras mostram várias isoformas de PDIs e RhoGDIs que em alguns casos têm um padrão macro- mas não microssintênico. Nestes últimos, não há anotação para PDIA8, PDIA2, RhoGDI β e RhoGDI γ , embora haja outras PDIs. A análise filogenética mostrou topologia semelhante entre as duas famílias. Análise do genoma de plantas mostra ausência de sintenia em algas e macrossintenia em plantas mais complexas, condizente com convergência evolutiva. Análise da expressão gênica evidenciou que as anotações em bancos de dados mostram expressão coincidente em diferentes tecidos e órgãos para os membros de cada par sintênico. A análise de possível correção entre os pares PDI/RhoGDI indica vários fatores de transcrição comuns aos distintos pares, com ontologias gênicas ligadas ao desenvolvimento, metabolismo e resposta imune.

Análises funcionais indicaram que a microssintenia não se associa à regulação *in trans* da expressão protéica (ao menos para PDIs), uma vez que a superexpressão da PDIA1 em modelo celular ou camundongo transgênico não gerou mudanças na expressão de RhoGDI α . Por outro lado, em um modelo de remodelamento vascular *in vivo* em que células endoteliais são induzidas em bloco à proliferação/migração, as mudanças da expressão gênica de PDIA1 e RhoGDI α foram correlacionadas. Finalmente, experimentos de co-localização e co-imunoprecipitação confirmam e ampliam nossas observações prévias indicando uma provável interação física entre PDIA1 e RhoGDI α .

A análise estrutural e funcional dos membros dos distintos pares sintênicos indica que em geral a homologia entre as isoformas da RhoGDI é relativamente maior do que entre as diferentes PDIs. No entanto, este fato pode ser devido às distintas arquiteturas modulares das PDIs. A PDIA2 foi identificada como um membro da família das PDIs, expressa especificamente no pâncreas (Desilva MG., et al, 1996). A PDIA2 tem um sítio redox ativo, porém é menos eficaz do que a P4HB em ensaios de oxidação e redução de pontes de dissulfeto (Desilva MG, et al, 1996). Além do seu papel como chaperona, PDIA2 desempenha um importante papel na produção e secreção de enzimas digestivas (Klappa P., et al, 1998). A regulação da síntese de estrógeno é também uma importante função dessa proteína (Fu XM, Zhu BT,

2009). Em geral, assim, a PDIA2 parece ter funções semelhantes à PDIA1, porém exibe um padrão específico de expressão tecidual. Por outro lado, a PDIA8 (ou ERP27) codifica uma proteína de 273 aminoácidos com estrutura bastante distinta da PDIA1. PDIA8 não contém motivos redox-ativos, contendo apenas domínios b e b' com enovelamento da tiorredoxina e uma sequência de retenção no retículo endoplasmático. PDIA8 interage diretamente com a PDIA3, outro membro da família das PDIs. A expressão da PDIA8 é encontrada em distintos tecidos, incluindo principalmente pâncreas. Embora sua função seja desconhecida, é possível antecipar a partir de sua estrutura um possível papel como chaperona. RhoGDI β , também conhecida como RhoGDI2, é expressa em alto nível em células hematopoiéticas, mas também tem sido encontrada em outros tecidos, bem como em células cancerígenas. RhoGDI β está associada com muitas RhoGTPases *in vitro*, no entanto com uma menor afinidade que RhoGDI α . No entanto, muitas destas interações não têm sido detectadas *in vivo*. RhoGDI γ ou RhoGDI3 é a mais divergente das 3 que contém uma única sequência amino-terminal e seu alvo é o complexo de Golgi e outras membranas celulares. RhoGDI γ é geralmente expressa em baixos níveis e interage predominantemente com RHOB e RHOG. Em conjunto, a análise das homologias indica que PDIs e RhoGDIs formam famílias de genes bem definidas, de acordo com suas funções relevantes à homeostase e regulação celular.

A abordagem utilizada em nosso estudo tem como base a observação de que genes fisicamente contíguos codificam para proteínas que frequentemente interagem tanto funcional como fisicamente. Um primeiro aspecto é o significado da microssintenia entre genes. Em procariotos, arranjos sintênicos formando "*operons*" são uniformes e bem conhecidos. Em eucariotos, por outro lado, a premissa usual é de uma distribuição randômica de genes. Entretanto, este quadro tem sido mudado recentemente com a identificação cada vez mais frequente de arranjos conservados de genes nos cromossomos que claramente não parecem ser casuais (revistos por Irimia et al, 2013). Os casos mais claros bem estudados são os "clusters" de beta-globina e Hox, que codificam sequências em tandem de vários genes relacionados, significativamente conservados em distintas espécies. Um

conceito emergente relevante a este fenômeno é o de genes conjugados ("conjoined genes") (Akiva et al, Parra et al, 2006; Prakash et al, 2010). Estes são genes fisicamente contíguos, usualmente com distâncias intergênicas menores que 10 kbases, nos quais freqüentemente se observa algum tipo de transcrito parcial ou totalmente comum aos dois genes. Estima-se que até 20% dos genes possam ser candidatos a genes conjugados. Neste sentido, cabe observar que PDIs e RhoGDIs preenchem todas as características da definição de genes conjugados. De fato, a investigação de uma base de dados de genes conjugados evidencia os três pares microssintênicos observados em nosso estudo, conservado em pelo menos 8 espécies distintas, três das quais não investigadas em nosso estudo devido à ausência de acesso ao genoma completo (Irimia et al, 2012). Além disso, pesquisa no banco de dados ChimerDB (Kim et al 2006) mostra que pelo menos PDIA2 e RhoGDI γ podem evidenciar um pré-mRNA comum a ambos (i.e., sem parada na transcrição), embora durante o processamento eles sejam separados individualmente. Estes dados largamente confirmam a análise realizada em nosso estudo e indicam um contexto adicional de regulação gênica em eucariotos.

Um segundo aspecto a ser discutido é o mecanismo pelo qual o arranjo sintênico provê vantagens evolutivas e porque este tipo de organização ocorre com frequência mais comum do que previamente imaginado. O primeiro mecanismo, conforme já discutido, seria a ocorrência de transcritos comuns, formando genes conjugados (Kim et al, 2006), que ocorre pelo menos para um dos pares sintênicos abordados em nosso estudo, embora com frequência e importância desconhecidas. O segundo mecanismo, também operando em cis, seria a inserção do par microssintênico em um bloco genômico regulatório (Irimia et al, 2013), no qual os genes contíguos ao par (ou tríade) microssintênico(a) formam um bloco conservado, mas sem função relacionada à regulação transcricional ou funcional do par(ou tríade). Estes genes são denominados "by stander genes" e estão de fato inseridos em uma região intergênica conservada contendo vários elementos regulatórios do par microssintênico (ou tríade) (Irimia et al, 2013). Em nosso estudo, observamos um bloco de genes conservados contíguos a cada par microssintênico, cuja composição e ontologia é diferente conforme o par, exceto pela presença de

um terceiro gene codificando um regulador de PP1. Entretanto, não investigamos a existência de regiões intergênicas conservadas, de modo que este mecanismo regulatório está em aberto e é uma possibilidade. Além dos mecanismos em cis, outros mecanismos em trans podem também explicar vantagens evolutivas da sintenia. O mecanismo mais imediato em trans seria uma sinalização por feedback (via fatores de transcrição ou mecanismos epigenéticos) dependente de um balanço de expressão entre as proteínas do par microssintênico. Este mecanismo foi descartado em nosso estudo por experimentos em vários modelos de expressão forçada induzida em modelos celulares e camundongos transgênicos. No entanto, mecanismos em trans operando por vias epigenéticas independentes das proteínas expressas podem estar envolvidos. Uma análise pelo banco de dados miRDB mostrou 35 microRNAs dirigidos para a PDIA1 e 90 dirigidos para a RhoGDI α , com 4 microRNAs comuns a ambos: 6829, 6791, 5001 e 211. Este último foi abordado em projeto de nosso grupo (Tanaka et al, dados não publicados), juntamente com seu homólogo miR204, evidenciando efeito na regulação da expressão de PDIA1 durante remodelamento vascular dependente de fluxo. Outro mecanismo capaz de regular potencialmente genes adjacentes é o efeito de RNAs longos não codificantes capazes de influenciar a transcrição ou transcritos de ambos os genes. Em conjunto, a investigação desses mecanismos pode ter um escopo bastante amplo: é possível que distintas vantagens tenham sido angariadas ao longo da história evolutiva dessa microssintenia e eventualmente contribuíram para sua manutenção.

A história evolutiva da microssintenia PDI/RhoGDI tem vários aspectos bastante intrigantes. Procariotos apresentam genes precursores das PDIs, as proteínas Dsb, que em conjunto desempenham efeitos semelhantes aos da PDI no periplasma, embora as ações oxidase, redutase e isomerase estejam presentes em proteínas distintas e não na mesma proteína como no caso da PDI (Inaba, K, 2010). RhoGTPases e seus reguladores estão presentes em invertebrados, vertebrados, leveduras e plantas, mas não em procariotos. O modelo, baseado no conhecimento estabelecido, seria que a microssintenia teria ocorrido inicialmente por meio de duplicação gênica e a seguir o par microssintênico teria sido mantido devido às vantagens proporcionadas,

sofrendo especiação nas distintas isoformas. Com efeito, é bem conhecido que em peixes, a maioria dos genes foram duplicados e com o tempo, os segmentos sofreram translocações e modificações de nucleotídeos, gerando novas estruturas/funções para as proteínas. Nossa análise dos pares sintênicos indica que este fenômeno ocorreu ao longo da evolução de peixes, estabelecendo-se definitivamente a partir de anfíbios e organismos mais complexos. De fato, os peixes analisados em nosso estudo, com exceção do celacanto, mostram duplicação do gene da RhoGDI α , assim como de PPP1R27. Como parte da especiação, novos pares sintênicos são associados a expressões tecido-específicas, como de fato ocorreu particularmente com RhoGDI β e RhoGDI γ . Enquanto PDIA1 e RhoGDI α evidenciam expressão ubíqua nas células, PDIA2/RhoGDI γ são expressos principalmente em cérebro, pâncreas, pulmão e rim e PDIA8/RhoGDI β em pâncreas e células hematopoiéticas. A expressão dos pares sintênicos em um mesmo tecido é uma evidência adicional de uma provável relação funcional entre essas proteínas. É intrigante que esta possível especiação correlacionou-se com menor distância intergênica entre estes pares, que no caso do par PDIA2/RhoGDI γ chega tão somente a 0.14 kbases. Este quadro permite especular a tendência potencial a uma fusão gênica à medida que a evolução ocorre. No entanto, o quadro não é tão simples e várias evidências contradizem este modelo. Primeiro, vários peixes apresentam microssintenia para um dos pares (PDIA1/RhoGDI α) mas não para outros (PDIA2/RhoGDI γ) e expressam apenas um dos membros do par PDIA8/RhoGDI β . Segundo, plantas complexas apresentam macrossintenia desses genes, à semelhança de leveduras, mas a alga ancestral *C. reinhardtii*, cujo genoma está anotado, não evidencia tal sintenia. Terceiro, a análise filogenética não evidencia de modo claro uma evolução a partir de ancestral(is) comum(ns). Embora estes aspectos possam ser em parte devidos a anotações incompletas ou erradas dos genomas, as atenções se voltam para o intrigante modelo alternativo em que a microssintenia tenha ocorrido *de novo* distintas vezes ao longo da evolução. No caso de plantas complexas, em particular, há possibilidade de uma convergência evolutiva. É interessante notar que a análise dos genes de PDIs e RhoGDIs indica alta ocorrência de elementos *Alu*, associados a

transposições (dados não mostrados), embora estes elementos estejam comumente presentes em vários outros genes (Callinan PA, 2005). É interessante notar que todas as RhoGDIs estão microssintênicas a membros da família das PDIs, enquanto várias outras PDIs não são microssintênicas a nenhuma proteína ligada à família de RhoGTPases e seus reguladores. É possível, assim, que as vantagens angariadas pela microssintenia sejam mais relacionadas às funções de RhoGDIs e RhoGTPases do que de PDIs. Certamente estes aspectos requerem investigação mais profunda em outros modelos de microssintenia.

Outro aspecto intrigante é que o estabelecimento da microssintenia não parece ter obedecido a uma ordem cronológica ou de complexidade óbvia, com alguns representantes aparentemente se "antecipando" na escala de tempo, em particular o nematóide *C. elegans* e o peixe ancestral celacanto. Embora este fato seja comum para outros genes e difícil de equacionar devido à alta complexidade, é possível propor que um elemento comum indicativo de maior probabilidade de ocorrência da microssintenia PDI/RhoGDI foi a passagem do ambiente aquático para o terrestre, uma vez que *C. elegans* vive em ambiente terrestre e o celacanto é um precursor bem estudado de tetrápodos terrestres. Com efeito, a passagem para o ambiente terrestre foi um estímulo importante à maior complexidade de diversos órgãos, tais como pulmões, circulação feto-placentária e rins. Neste sentido, é interessante notar que o fenótipo do silenciamento genético de RhoGDI α em camundongos é uma importante malformação renal (Garcia-Mata et al, 2011). Além disso, a ontologia gênica dos fatores de transcrição preditos em nosso estudo a partir da análise dos sítios de ligação comuns aos distintos pares PDI/RhoGDI em humanos, ratos e camundongo indica processos de desenvolvimento como uma das mais importantes. Este fato não surpreende, uma vez que a grande maioria dos genes microssintênicos e blocos genômicos regulados em eucariotos envolve genes ligados a desenvolvimento ou transcrição gênica (Irimia et al, 2013). Em conjunto, nossos dados sugerem que a microssintenia esteja ligada à maior complexidade de organização do organismo. Esta conclusão está de acordo com os efeitos biológicos preditos e/ou observados para a PDIA1 nos estudos de nosso grupo (revisados por Laurindo et al, 2012; Moretti e Laurindo, 2016).

Um dos aspectos peculiares de nosso estudo é o uso de análise genômica sistemática para gerar inferências que reforcem possíveis implicações funcionais. De fato, o padrão conservado e convergente de microssintenia dos genes, bem como o perfil de ontologias dos fatores de transcrição comuns aos distintos pares, é sugestivo de uma provável interação funcional significativa entre PDIs e RhoGDIs. Estes dados foram investigados neste estudo com foco no par PDIA1/RhoGDI α , expresso em células vasculares e previamente investigados em estudos do grupo (Laurindo et al, 2012). A correção observada entre as expressões gênicas de PDIA1 e RhoGDI α na camada íntima de vasos submetidos a remodelamento mediado por fluxo é consistente com os efeitos de PDIA1 observados previamente em nosso grupo. Estes incluem a migração e organização do citoesqueleto celular (Pescatore et al, 2012), bem como remodelamento vascular durante reparação à lesão e mecanoadaptação em resposta a estímulos biomecânicos (Tanaka et al, 2016). Os efeitos da PDIA1 na regulação do citoesqueleto celular parecem extrapolar o papel dessa PDI na regulação do complexo Nox NADPH oxidase, bastante estudado por nosso grupo e per se um sistema regulador do citoesqueleto (Moretti e Laurindo, 2016). Os efeitos de RhoGDI α são também bastante relacionados, tendo em vista seu papel na regulação de RhoGTPases, que são reguladores centrais do citoesqueleto celular (Garcia-Mata et al, 2011). Silenciamento de RhoGDI α em células musculares lisas vasculares inibe a migração celular (Boulter et al, 2010) e dados preliminares de nosso grupo). Neste sentido, a identificação de um terceiro membro associado aos pares sintênicos PDI/RhoGDI, com função reguladora da fosfatase proteica-1 (PP1), é interessante. PP1 é uma fosfatase intrinsecamente relacionada à resposta integrada de estresse celular (Santos CX et al, 2016); em particular, estudos do interatoma da PP1 indicam convergência com genes ligados à polarização celular (Hendrickx et al, 2009), um fenômeno sabidamente associado à organização do citoesqueleto e às funções de RhoGDIs e PDIA1.

Neste contexto, a interação física entre PDIA1 e RhoGDI α detectada por co-imunoprecipitação e co-localização em células endoteliais neste estudo

reforça nossas observações prévias em células musculares lisas (Pescatore et al, 2012) e amplia os dados de nosso grupo quanto à convergência funcional importante entre PDIA1 (e talvez outras PDIs) e citoesqueleto celular via RhoGTPases. A interação física entre PDIA1 e RhoGDI α levanta uma questão desafiadora, i.e., como uma proteína canonicamente localizada no RE (PDI) interage fisicamente com outra localizada no citoplasma (RhoGDI). Os controles realizados em nossos experimentos (diferentes anticorpos em distintas preparações) permitem a princípio excluir problemas técnicos interferentes. Embora a resposta a esta pergunta não esteja clara, existem precedentes na literatura para outras proteínas. Alguns exemplos incluem a SOD1 localizada no RE e interagindo com PDI e mTOR no RE. Existe ainda crescente evidência de que PDIA1 pode se localizar na fração citosólica em neutrófilos (Paes et al, 2011) ou em células musculares lisas vasculares (Sobierajska et al, 2014). Uma possibilidade intrigante é que as proteínas possam interagir em momentos específicos nos quais possa haver certa desestruturação do RE, por exemplo durante a divisão celular. De fato, foi reportado um possível efeito da RhoGDI β neste processo (Jiang et al, 2012). De qualquer modo, a convergência entre PDIs e RhoGDIs é inesperada, tendo em vista as distintas topologias entre os dois sistemas, bem como as funções previamente conhecidas de PDIs.

6. Conclusões

6. Conclusões

Em conjunto, a investigação do padrão de microssintenia entre os genes de RhoGDIs e PDIs indica uma ocorrência específica para cada isoforma de RhoGDI, com padrão extremamente conservado. A história evolutiva desse fenômeno indica que sua ocorrência coincidiu com maior complexidade dos organismos e provavelmente com sua passagem do meio aquático para o terrestre. A ocorrência de sintenia destes pares em plantas sem que haja um ancestral comum identificável é intrigante e sugestiva de uma potencial convergência evolutiva paralela. Embora os mecanismos que sustentem estas microssintenias sejam complexos e mereçam extensas investigações, nossos dados indicam convergência funcional entre PDIA1 e RhoGDI α , embora a co-regulação entre os genes não pareça depender da expressão das proteínas codificadas em trans.

Estas observações vão ao encontro de vários outros resultados de nosso grupo indicando que PDIA1 exerce importante regulação da arquitetura do citoesqueleto (Pescatore et al, 2012; Moretti e Laurindo - em revisão) e do remodelamento vascular (Tanaka et al, 2016). Em conjunto, estes resultados reforçam significativamente a convergência funcional entre RhoGDIs e membros da família das PDIs, com implicações funcionais na organização do citoesqueleto e morfologia celular. Além disso, estes resultados reforçam a noção de que a distribuição de genes nos distintos cromossomos não é randômica e o estudo da arquitetura da organização gênica pode fornecer subsídios ao entendimento da regulação de sistemas biológicos.

7. Referências

7. Referências

Alloul, Nathalie, et al. "Activation of the superoxide-generating NADPH oxidase by chimeric proteins consisting of segment soft cytosolic component p67phox and the small GTPase Rac1." *Biochemistry* 40.48 (2001): 14557-14566.

Appenzeller-Herzog, Christian, and Lars Ellgaard. "The human PDI family: versatility packed into a single fold." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1783.4 (2008): 535-548.

Araujo, T. Estudo da rota de externalização da dissulfeto isomerase protéica (PDIA1) em células endoteliais. 2015. 109f. Tese (Doutorado em cardiologia) – Laboratório de biologia Vascular, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

Arkin, A.P. and D.V. Schaffer, Network news: innovations in 21st century systems biology. *Cell*, 2011. 144(6): p. 844-9.

Blumenthal, Thomas. "Operons in eukaryotes." *Briefings in functional genomics & proteomics* 3.3 (2004): 199-211.

Bouter, E., et al., *Regulation of Rho GTPases crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1*. *Nature Cell Biology* 2010. 12(5): p. 477-483.

Casane, Didier, and Patrick Laurenti. "Why coelacanths are not 'living fossils'." *Bioessays* 35.4 (2013): 332-338.

Clempus, R.E. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells*. *Cardiovasc Res*, 2006.71(2): p. 216-25.

DerMardirossian, C., et al., *Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling*. *Molecular Biology of the Cell*, 2006. 17: p. 4760-4768.

Desilva MG, Lu J, Donadel G, Modi WS, Xie H, Notkins AL, Lan MS: Characterization and chromosomal localization of a new protein disulfide isomerase, PDIp, highly expressed in human pancreas. *DNA Cell Biol* 1996, 15:9–16.

Dusting, G.J., S. Selemidis, and F. Jiang, Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005. 100 Suppl 1: p. 97-103.

Ellgaard L, Ruddock LW: The human protein disulphideisomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep* 2005, 6:28–32.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. *Nature* 2002. 420: p. 629-635.

Fernandes, D.C., et al., Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous pre emptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: Effects of nitrosothiol exposure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009.489: p. 197-204

Fu XM, Zhu BT: Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is an intracellular estrogen-binding protein that modulates estrogen levels and actions in target cells. *J Steroid BiochemMolBiol* 2009, 115:20–29.

Galligan, James J.,and Dennis R. Petersen. "The human protein disulfide isomerase gene family." *Human genomics* 6.1 (2012): 1.

Garcia-Mata R, Boulter E, Burridge K. (2011). The invisible hand: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(8): 493–504.

Harter, Cordula, and Felix Wieland. "The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1286.2 (1996): 75-93.

Hendrickx, Annick, et al. "Docking motif-guided mapping of the interactome of protein phosphatase-1." *Chemistry & biology* 16.4 (2009): 365-371.

Hubbard, T., et al. "The Ensembl genome database project." *Nucleic acids research* 30.1 (2002): 38-41.

Inaba K, Masui S, Iida H, Vavassori S, Sitia R , Suzuki M. (2011). Crystal structures of human Ero1a reveal the mechanisms of regulated and targeted oxidation of PDI. *The EMBO Journal.* 29: 3330–3343.

Irimia M, Tena JJ, Alexis MS, Fernandez-Minan A, Maeso I, Bogdanovic O, Calle-Mustienes E, Roy SW, Gomez-Skarmeta JL, Fraser HB. (2012). Extensive Conservation of ancient Microsynteny across metazoans due to cis-regulatory constraints. *Genome Res.* 22: 2356–2367.

Irimia, Manuel, et al. "Ancientcis-regulatory constraints and the evolution of genome architecture." *Trends in Genetics* 29.9 (2013): 521-528.

J.J. Galligan, D.R. Petersen, The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum. Genomics*, 6 (2012), p.6

J.J. Galligan, D.R. Petersen, The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum. Genomics*, 6 (2012), p.6

Janiszewski, M., et al., Regulation of NAD(P)H oxidase bt associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(49): p. 40813-40819.

Jiang, Yong-Sheng, et al. "Centrosomal localization of RhoGDI β and its relevance to mitotic processes in cancer cells. *International journal of oncology*. 42.2 (2013): 460-468.

Johnson, J.L., J.W. Erickson, and R.A. Cerione, New insights into how the Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor regulates the interaction of Cdc42 with membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 2009.284(35): p. 23860-23871

Jones, D.P., Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 2006. 8(9-10): p. 1865-79

Karolchik, Donna, et al. "The UCSC genome browser database." *Nucleic acids research*. 31.1 (2003): 51-54.

Kawahara, Tsukasa, Mark T. Quinn, and J. David Lambeth. "Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes." *BMC Evolutionary Biology* 7.1 (2007): 109.

Klappa P, Stromer T, Zimmermann R, Ruddock LW, Freedman RB: A pancreas-specific glycosylated protein disulphide-isomerase binds to misfolded proteins and peptides with an interaction inhibited by oestrogens. *Eur J Biochem* 1998, 254:63–69.

Kim E, Simpson AGB, Graham LE. (2006) Evolutionary Relationships of Apusomonads Inferred from Taxon-Rich Analyses of 6 Nuclear Encoded Genes. *Mol. Biol. Evol.* 23(12):2455–2466.

Kozlov, G., et al., A structural overview of the PDI family of proteins. *The FEBS Journal*, 2010.277: p. 3924-3936

Kumar, Sudhir, Koichiro Tamura, and Masatoshi Nei. "MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment." *Briefings in bioinformatics* 5.2 (2004): 150-163.

Lassègue, Bernard, and Kathy K. Griendling. "NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30.4 (2010): 653-661.

M. O'Brien, D. Flynn, B. Mullins, J.J. Morrison, T.J. Smith *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 6 (2008), p. 1

Manickam, Nagaraj, et al. "RhoA/Rhokinase mediates TGF- β 1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 307.2 (2014): F159-F171.

McArthur AG, Knodler LA, Silberman JD, Davids BJ, Gillin Fd, Sogin ML: The evolutionary origins of eukaryotic protein disulfide isomerase domains: new evidence from the Amitochondriate protist *Giardia lamblia*. *Mol Biol Evol* 2001, 18:1455–1463.

Melo D, Marroig G. 2015. Directional selection can drive the evolution of modularity in complex traits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112:470–5

Meyer, Axel, and Sarah I. Dolven. "Molecules, fossils, and the origin of tetrapods." *Journal of molecular evolution* 35.2 (1992): 102-113.

Olofsson, B., Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, 1999. 11(8): p. 545-54

Paes, MA, Verissimo-Filho S, Guimaraes LL, Silva AC, Takiuti JT, Santo CX, Janiszewski M, Laurindo FR, Lopes LR. (2011) Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. *J Leukoc Biol* 90(4):799-810.

Passarge, E., Horsthemke, B., and Farber, R. A. (1999). Incorrect use of the terms synteny. *Nature Genetics*, 23:387. 1, 26

Pechlivanis, Markos, and Juergen Kuhlmann. "Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids—more than just membrane anchoring." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1764.12 (2006): 1914-1931.

Pescatore LA, Bonatto D, Forti FL, Sadok A, Kovacic H, Laurindo FR. Protein disulfide isomerase is required for platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration, Nox1 NADPH oxidase expression, and RhoGTPase activation. *J Biol Chem*. 2012 Aug 24;287(35):29290-300.

Prakash, Tulika, et al. "Expression of conjoined genes: another mechanism for gene regulation in eukaryotes." *PloSone* 5.10 (2010): e13284.

Prakash, Tulika, et al. "Expression of conjoined genes: another mechanism for gene regulation in eukaryotes." *PloSone* 5.10 (2010): e13284.

Ruddock LW: ERp27, a new non-catalytic endoplasmic reticulum-located human protein disulfide isomerase family member, interacts with ERp57. *J Biol Chem* 2006, 281:33727–33738.

Saitou N, Nei M. "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution*, volume 4, issue 4, pp. 406-425, July 1987.

Santos CX, et al. (2016). Targeted redox inhibition of protein phosphatase 1 by Nox4 regulates eIF2 α -mediated stress signaling. *The EMBO Journal*. 35: 319-334.

Seon D and Hahn Y. (2012). Human-specific protein isoforms produced by novel splice sites in the human genome after the human-chimpanzee divergence. *BMC Bioinformatics* 13 (299): 1-8.

Sigal, Natalia, et al. "The Guanine Nucleotide Exchange Factor Trio Activates the Phagocyte NADPH Oxidase in the Absence of GDP to GTP Exchange on Rac "THE EMPEROR'S NEW CLOTHES"." *Journal of Biological Chemistry* 278.7 (2003): 4854-4861.

Sobierajska K, Skurzynski S, Stasiak M, Kryczka J, Cierniewski CS, Swiatkowska M. (2014) Protein disulfide isomerase directly interacts with beta-actin Cys374 and regulates cytoskeleton reorganization. *J Biol Chem* 289(9): 5758-73.

Tanaka, Leonardo Y., et al. "Peri/epicellular protein disulfide isomerase sustains vascular lumen caliber through an anti constrictive modeling effect." *Hypertension* 67.3 (2016): 613-622.

Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20410-6.

Tian, Geng, et al. "The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites." *Cell* 124.1 (2006): 61-73.

Trachtulec, Z. "Eukaryotic operon genes can define highly conserved syntenies." *Folia Biologica -Praha-* 50.1 (2004): 1-6.

Wang C, Yu J, Huo L, Wang L, Feng W, Wang CC. Human protein-disulfide isomerase is a redox regulated chaperone activated by oxidation of domain a'. *J Biol Chem.* 2012;287(2):1139-49.

Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1699(1-2):35-44.

Willems SH, Tape CJ, Stanley PL, Taylor NA, Mills IG, Neal DE, et al. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J.* 2010;428(3):439-50.

Winterbourn, CC. "Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species." *Nature chemical biology* 4.5 (2008): 278-286.

Wright LP, Philips MR. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res.* 47:883-891